

Université de Montréal

**Développement de mimétiques du sialyl Lewis^X
comportant une unité tartrate différenciée par
l'incorporation d'un pharmacophore anionique**

par Audrey Belouin

Département de chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Avril 2018

© Audrey Belouin, 2018

Résumé

Les sélectines E et P sont des cibles thérapeutiques importantes pour traiter les maladies inflammatoires. En effet, elles jouent un rôle clé dans le recrutement de leucocytes au site d'inflammation. En réponse à un stimulus inflammatoire, les cellules endothéliales des parois vasculaires expriment les sélectines E et P dont les ligands ESL-1 et PSGL-1 sont situés à la surface des leucocytes. Ces protéines d'adhésion interagissent avec le tétrasaccharide sialyl Lewis^X présent sur ESL-1 et PSGL-1 afin de médier le roulement et la capture des leucocytes au site de l'inflammation. Malheureusement, une accumulation excessive de leucocytes peut mener à plusieurs conditions aiguës ou chroniques, telles que l'accident vasculaire cérébral, les crises vaso-occlusives, l'arthrite rhumatoïde et les maladies respiratoires. Les sélectines sont également impliquées dans la métastase des cellules cancéreuses. Par conséquent, il existe un réel besoin de trouver des antagonistes des sélectines, tels que des analogues du sLe^X. Des études récentes ont permis d'en savoir davantage sur la conformation bioactive de sLe^X ainsi que d'identifier les pharmacophores importants à la liaison. Une première génération de mimétiques du sLe^X comportant un tartrate précédemment rapporté par notre laboratoire a été testé et a démontré une activité prometteuse. En se basant sur ces résultats, l'objectif de mes travaux de maîtrise décrits dans ce mémoire était la synthèse d'une seconde génération de d'analogues où le tartrate est fonctionnalisé avec une chaîne latérale qui possède un pharmacophore anionique afin de lier un second site de liaison sur les sélectines. Des études préliminaires ont permis d'identifier 2 candidats ayant une meilleure activité que la première génération.

Mots-clés : Sialyl Lewis^X, Sélectines, Synthèse totale, Inflammation, Hydrates de carbone, Tartrate, Mimétiques, Analogues

Abstract

E- and P-selectins are important drug targets for treating inflammation related diseases. They play a key role in leukocyte recruitment at sites of injury, which is an important defense mechanism of the immune system. In response to inflammatory stimuli, the vascular cell walls express E- and P-selectins that bind to complementary transmembrane glycoprotein ligands ESL-1 and PSGL-1 located on the surface of leukocytes. These adhesion proteins interact with sialyl Lewis^X, a tetrasaccharide bound to ESL-1 and PSGL-1 to mediate the rolling and capture of leukocytes at sites of inflammation. Unfortunately, excessive infiltration or accumulation of leukocytes leads to several acute or chronic conditions such as stroke, rheumatoid arthritis and respiratory diseases. E- and P-selectins are also involved in cancer metastasis and in complications for sickle cell diseased patients. Therefore, there is a medical need for drugs that could prevent this excessive recruitment of leukocytes, such as novel sLe^X analogues. Recent studies have provided insights into the bioactive conformation of sLe^X binding to E- or P-selectins, revealing key pharmacophores. Previously, a first generation of tartrate-based mimetics synthesized and tested by our group have exhibited exciting results. Building upon these results, the objectives of my Master's research presented in this thesis was to synthesize a second generation of sLe^X mimetics functionalized at the acyclic tartrate tether with a side chain bearing an anionic pharmacophore could afford favorable interactions with a second binding site on the selectins. Preliminary results allowed us to isolate two analogues presenting better activity than our first generation of antagonists.

Keywords : Sialyl Lewis^X, Selectins, Total synthesis, Inflammation, Carbohydrates, Tartrate, Mimetics, Analogues

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des Schéma.....	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xviii
1. Introduction.....	1
1.1. L'inflammation	1
1.1.1. Maladies inflammatoires chroniques	1
1.1.2. Traitements existants	2
1.2. Le processus inflammatoire	3
1.3. Sélectines et leurs ligands	4
1.4. Sialyl Lewis ^X	7
1.4.1. Interaction sLe ^X /E-LE ou sLe ^X /P-LE	8
1.4.2. Interaction PSGL-1/Sélectine P	9
1.5. Antagoniste des sélectines	11
1.5.1. Implication des sélectines dans certaines pathologies	11
1.5.2. Modulation de l'activité des sélectines	14
2. Chimie des hydrates de carbone	18
2.1. Introduction.....	18
2.2. Généralités, nomenclature et structure des hydrates de carbone	19
2.3. Effet anomère.....	20
2.4. La glycosylation.....	21
2.4.1. Formation de liens glycosidique de façon stéréosélective	22
2.4.2. Assistance anchimérique.....	24
2.4.3. Méthodes de glycosylation	25
3. Mimétiques du sialyl Lewis ^X	27

3.1.	Historique.....	27
3.2.	Étude du pharmacophore du sialyl Lewis ^X	27
3.2.1.	Modification du résidu fucose	27
3.2.2.	Modification du résidu galactose	28
3.2.3.	Modification du résidu acide neuraminique	29
3.2.4.	Modification du résidu glucosamine.....	30
3.3.	Mimétiques du sialyl Lewis ^X dans la littérature	31
3.4.	Mimétiques du sialyl Lewis ^X rapportés par notre laboratoire.....	34
3.4.1.	Utilisation du tartrate comme espaceur.....	34
3.4.2.	Effet des groupements sur le résidu galactose	36
3.4.3.	Effet de la nature des esters sur le tartrate	38
3.4.4.	Conclusion	40
4.	Synthèse d'une nouvelle génération de mimétiques du sialyl Lewis ^X	41
4.1.	Conception de la nouvelle génération.....	41
4.2.	Synthèse du résidu galactose	42
4.2.1.	Voie de synthèse existante	43
4.2.2.	Développement d'une nouvelle voie de synthèse.....	48
4.2.3.	Suite de la synthèse du résidu galactose	55
4.3.	Synthèse de la moitié Fucose-Tartrate.....	59
4.3.1.	Synthèse du résidu fucose	59
4.3.2.	Différentiation des esters du tartrate	60
4.3.3.	Synthèse des chaînes latérales	62
4.4.	Fin de la synthèse des analogues (R) et (S)	64
4.4.1.	Estérification et glycosylation du résidu fucose-tartrate au résidu galactose ...	64
4.4.2.	Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen	66
4.4.3.	Couplage avec différents nucléophiles	70
4.4.4.	Déprotection finale des analogues	73
4.4.5.	Conclusion	76
5.	Résultats biologiques et amarrage moléculaire.....	77
5.1.	Test d'adhésion dynamique <i>in vitro</i> (Biacore TM).....	77
5.1.1.	Concept	78

5.1.2.	Détails sur les tests.....	81
5.1.3.	Résultats.....	83
5.2.	Test d'adhésion cellulaire statique <i>in vitro</i>	85
5.2.1.	Adhésion cellule-cellule.....	86
5.2.2.	Adhésion sélectine-cellule	89
5.3.	Modèle de lésion péritonéale sur les souris	91
5.4.	Amarrage moléculaire.....	93
6.	Synthèse des analogues amides du tartrate	95
6.1.	Introduction.....	95
6.2.	Analogues de la première génération.....	95
6.2.1.	Synthèse de la moitié fucose-amide tartrate	96
6.2.2.	Glycosylation avec le résidu galactose	101
6.3.	Analogues amides de la deuxième génération	102
6.4.	Conclusion	105
	Conclusion générale.....	106
	Partie expérimentale.....	107
	Bibliographie.....	109
	Annexe A : Partie expérimentale et caractérisation	i
	Section expérimentale du chapitre 4	ii
	Section expérimentale du chapitre 6	lxviii
	Bibliographie : Partie expérimentale	lxxv

Liste des tableaux

Tableau 1.	Résultats biologiques associés à différents groupements sur le galactose.....	37
Tableau 2.	Résultats biologiques associés à différents groupements sur le résidu galactose et différents esters du tartrate	39
Tableau 3.	Tentatives de l'alkylation en C3 pour obtenir 4.4	54
Tableau 4.	Tentatives d'optimisation de l'alkylation sélective utilisant un acétal d'étain .	56
Tableau 5.	Optimisation de la formation de la dioxolanone 4.27	62
Tableau 6.	Tentative de réduction de l'ester 4.29 comportant un groupement TBS	63
Tableau 7.	Optimisation des conditions de CuAAC sur des substrats modèles	69
Tableau 8.	Différentes conditions de CuAAC avec différents alcynes	70
Tableau 9.	Optimisation de l'hydrogénation sur le substrat modèle 4.58	74
Tableau 10.	Conditions tentées pour l'obtention de 6.5	97
Tableau 11.	Tentatives de glycosylation de 6.6	98
Tableau 12.	Optimisation des conditions de couplage peptidique pour former 6.6	100
Tableau 13.	Optimisation de la réduction de 6.12	103

Liste des Schéma

Schéma 1.	Réaction de <i>O</i> -glycosylation.....	22
Schéma 2.	Mécanisme général de la glycosylation en absence de groupement participant.....	23
Schéma 3.	Mécanistique de la formation d'un lien glycosidique α ou β pour le système mannose 4,6-benzylidène.....	24
Schéma 4.	Mécanisme général de la glycosylation avec assistance anchimérique (pour les sucres ayant l'hydroxyle en C2 vers le bas).....	25
Schéma 5.	Mécanisme de glycosylation par l'activation d'un thioglycoside par l'utilisation des promoteurs NIS/TfOH.....	26
Schéma 6.	Rétrosynthèse de la synthèse des nouveaux mimétiques de sLe ^x	42
Schéma 7.	Rétrosynthèse du résidu galactose.....	43
Schéma 8.	Thioglycosylation du galactose pentaacétate.....	44
Schéma 9.	Synthèse de l'intermédiaire 4.3	44
Schéma 10.	Le traitement d'un acétal d'étain avec un électrophile résulte en une monosubstitution sélective.....	45
Schéma 11.	Mécanisme proposé pour expliquer la régiosélectivité de la substitution sur un acétal d'étain lorsqu'il y a un nucléophile ajouté	47
Schéma 12.	Alkylation sélective en C3 afin d'obtenir 4.4	48
Schéma 13.	Protection sélective en C3 dans la littérature et possibilité de synthèse de 4.4	49
Schéma 14.	Benzoylation sélective en C2 dans la littérature	50
Schéma 15.	Conditions rapportées pour l'ouverture sélective d'un 2,3-orthobenzoate	50
Schéma 16.	Tentative non réussie de la formation d'un 2,3-orthobenzoate sur 4.3	51
Schéma 17.	Quatre étapes pour l'obtention de l'hydroxyle libre en C3.....	52
Schéma 18.	Séquence visant l'obtention de 4.4 en passant par 4.14	52
Schéma 19.	Deux dernières étapes de la synthèse du résidu galactose	57
Schéma 20.	Rétrosynthèse de la moitié fucose-tartrate	59
Schéma 21.	Synthèse du résidu fucosidique 4.25	60
Schéma 22.	Deux étapes menant à 4.27 à partir de 4.25	61
Schéma 23.	Synthèse des fragments énantiomères 4.38a et 4.38b	64
Schéma 24.	Synthèse de l'intermédiaire 4.40 à partir de la dioxolanone 4.27	65

Schéma 25.	Glycosydaton du galactoside 4.21 avec la moitié fucose-tartrate 4.40	65
Schéma 26.	Cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azoture.....	66
Schéma 27.	Mécanisme de la CuAAC proposé par Sharpless ^{150,153}	67
Schéma 28.	Mécanisme de la réaction de CuAAC proposé par Fokin en 2013 ¹⁵⁹	68
Schéma 29.	Couplage peptidique de 4.48a et 4.48b avec différents nucléophiles.....	72
Schéma 30.	Hydrogénation des différents analogues préparés	75
Schéma 31.	(A) Test d'adhésion Cellule-Cellule (B) test d'adhésion Sélectine-Cellule	86
Schéma 32.	Étapes clés de l'isolation des leucocytes du péritoine inflammé.....	92
Schéma 33.	Rétrosynthèse de l'analogue amide de la première génération.....	96
Schéma 34.	Tentative d'obtenir 6.5 en passant par le diacide 6.4	96
Schéma 35.	Clivage acide de l'isopropylidène.....	97
Schéma 36.	L'aminolyse de 4.25 n'est pas concluante	99
Schéma 37.	Glycosylation du résidu fucose-tartrate diamide avec le résidu galactose	101
Schéma 38.	Synthèse de l'intermédiaire 6.12	102
Schéma 39.	Dernières étapes de la synthèse des fragments 6.15	104
Schéma 40.	Vers la formation des analogues amides de deuxième génération	104

Liste des figures

Figure 1.	Cascade de l'acide arachidonique et où agissent les AIS et les AINS ⁶	2
Figure 2.	Structure et emplacement des sélectines et leurs ligands.....	4
Figure 3.	Roulement et ralentissement des leucocytes médiés par la faible interaction entre sLe ^x et les sélectines E et P.	6
Figure 4.	Structure du sLe ^x	7
Figure 5.	Interactions importantes pour la liaison de sLe ^x à E-LE ³³	8
Figure 6.	Liaison de PSGL-1 à la sélectine P par l'interaction du tétrasaccharide sLe ^x et des tyrosines sulfates.....	9
Figure 7.	Surface électrostatique de la P-LE lié à SGP-3 ³³	10
Figure 8.	Interactions importantes pour la liaison des sulfotyrosines de SGP-3 à P-LE	11
Figure 9.	Implication des sélectines dans l'extravasation des cellules cancéreuses	12
Figure 10.	Implication des sélectines et autres molécules d'adhésion dans les crises vaso-occlusives chez les patients atteints d'anémie falciforme ⁴⁷	13
Figure 11.	Un antagoniste en compétition avec les ligands naturels des sélectines.....	14
Figure 12.	Structure et activité de Bimosiamose et Rivipansel.....	16
Figure 13.	Numérotation du galactose et appellation D/L	19
Figure 14.	Nomenclature α/β	20
Figure 15.	Recouvrements orbitaux expliquant l'effet anomérique	21
Figure 16.	Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu fucose	28
Figure 17.	Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu galactose.....	29
Figure 18.	Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu acide neuraminique	30
Figure 19.	Résidu glucosamine servant d'orienteur pour les résidus fucose et galactose..	31
Figure 20.	Activité envers la sélectine E pour différents groupes remplaçant NeuAc.	32
Figure 21.	Différents espaceurs cycliques et acycliques remplaçant GlcNAc.....	33
Figure 22.	Analogue de Ernst obtenu par <i>fragment-based drug discovery</i>	33

Figure 23.	(A) Travaux ayant mené à l'utilisation du tartrate comme espaceur (B) Conformation d'un dérivé du L-tartrate confirmé par rayons X (C) Effets stabilisants en projection de Newman	35
Figure 24.	Structure générale des mimétiques basés sur le L-tartrate	35
Figure 25.	Analogue comportant un benzoate en C2 du galactose	36
Figure 26.	Analogue dimérique 3.38 du sLe ^x	39
Figure 27.	Meilleur candidat de la première génération	40
Figure 28.	Structure dimérique d'un acétal d'étain	46
Figure 29.	Intermédiaire impliquant deux atomes de cuivre dans le mécanisme proposé par Fokin et Finn en 2005 ¹⁵⁵	67
Figure 30.	Structure du produit 4.44	69
Figure 31.	Librairie des mimétiques synthétisés	76
Figure 32.	Phénomènes observables lorsqu'un faisceau lumineux est dirigé à travers un prisme semi-circulaire à différents angles.	78
Figure 33.	Résonance des plasmons de surface	79
Figure 34.	(A) La variation du poids moléculaire sur la feuille d'or est responsable du changement de l'angle SPR. (B) Conversion des angles de SPR en signal de résonance	80
Figure 35.	Expérience de compétition par SPR	82
Figure 36.	Profil d'affinité entre un antagoniste et P/E-Sel par mesure de signal SPR à différentes concentrations	83
Figure 37.	Profil d'affinité de LCB-111, LCB-2218 et LCB-2219	84
Figure 38.	Profil d'affinité avec la sélectine E et la sélectine P	85
Figure 39.	Adhésion cellule-cellule lorsque la sélectine E est exprimée	88
Figure 40.	Adhésion sélectine P-Fc/cellule	89
Figure 41.	Photos de la fluorescence des leucocytes pour les tests P-Sel-Fc/cellule en utilisant un bloqueur	90
Figure 42.	Résultats des lavages péritonéaux	93
Figure 43.	Résultats d'amarrage moléculaire de LCB-2219 et LCB-2238 avec P-LE	94
Figure 44.	Sous-produits majoritaires lors de la glycosylation	99
Figure 45.	Analogues amides de la deuxième génération	102

Liste des abréviations

α	Alpha
$[\alpha]_D$	Rotation optique (Raie D du sodium)
Å	Angström
Ac	Acétyle
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
app	Apparent
aq.	Aqueux
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate
atm	Atmosphère
β	Bêta
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyle
Bz	Benzoyl
<i>c</i>	Concentration en g/100mL
°C	Degré Celsius
Calcd	<i>Calculated</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCR5	C-C chimiokine de type 5
CD11b	<i>Cluster of differentiation molecule 11</i>
<i>cis</i>	Du même côté

CIP	<i>Contact ion pair</i>
COX	Cyclo-oxygénase
CSA	Acide camphosulfonique
CuAAC	<i>Copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition</i>
CVO	Crise vaso-occlusive
d	Doublet
D	Dextrogyre
δ	Déplacement chimique
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet de doublet
ddd	Doublet de doublet de doublet
DFT	<i>Density functional theory</i>
DIBAL-H	Hydrure de diisobutylaluminium
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMP	Diméthoxypropane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTST	Diméthyl(méthylthio)sulfonium trifluoromethanesulfonate
dt	Doublet de triplet
EDC	<i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
éq.	Équivalent

Et	Éthyle
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand 1</i>
FBDD	<i>Fragment-based drug discovery</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
Fuc	Fucose
g	Gramme
Gal	Galactose
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
Glu	Glutamate
GP	Groupe protecteur
h	Heure
HAUT	Hexafluorophosphate azabenzotriazole tétraméthyle uronium
HDMEC	<i>Human dermal microvascular endothelial cells</i>
His	Histamine
HL-60	<i>Human leukemic cell line 60</i>
HMDS	Bis(triméthylsilyl)aminure
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HRSM	Spectrométrie de masse haute résolution
Hz	Hertz
<i>i</i>	<i>iso</i>
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Immunoglobuline G

IL	Interleukine
<i>In vacuo.</i>	<i>In a vacuum</i>
<i>In vitro</i>	Dans le verre
<i>In vivo</i>	Au sein du vivant
IR	Infrarouge
<i>J</i>	Constante de couplage
<i>L</i>	<i>Lévogyre</i>
L	Litre
LE	<i>Lectin and EGF domain</i>
Leu	Leucine
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LTB₄	Leucotriène B ₄
LY6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
LY6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D</i>
Lys	Lysine
m	Multiplet
M	Molaire (mol/L)
Mac-1	Macrophage antigène 1
Mbp	2-Méthyl-5- <i>tert</i> -butylphényle
Me	Méthyle
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimole

mol	Mole
Ms	Méthanesulfonyle
MS	Tamis moléculaire
MW	Masse moléculaire
m/z	Ratio masse sur charge
n	Doublet non liant
N	Normale
napht	Naphtalène
N.D.	Non déterminé
NeuAc	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimide
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
nM	Nanomolaire
Nu	Nucléophile
Pd/C	Palladium sur charbon
Ph	Phényle
Phe	Phenylalanine
ppm	Partie par million
Pr	Propyle
Pro	Proline
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PTSA	Acide paratoluènesulfonique
Py ou Pyr	Pyridine
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

q	Quadruplet
Quant.	Quantitatif
R	<i>Rectus</i>
Rel	Relatif
R_f	Facteur de rétention
RMN (NMR) ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN (NMR) ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RU	Unité de résonance
σ*	Orbitale antiliante
s	Singulet
S	<i>Sinister</i>
SAR	<i>Structure-activity relationship</i>
Sel	Sélectine
Ser	Sérine
SGP-3	<i>Trisulfated sLe^X-glycosylated peptide</i>
sLe^X	Sialyl Lewis ^X
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SPR	<i>Surface plasmons resonance</i>
SSIP	<i>Solvent-seperated ion pair</i>
STD	<i>Saturation-transfert difference</i>
θ	Thêta
t	Triplet
t	<i>tert</i>

T°	Température
TBA	<i>tert</i> -Butylammonium
TBS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
td	Triplet de doublet
tdd	Triplet de doublet de doublet
Tf	Trifluorométhanesulfonyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
TMS	Triméthylsilyle
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
tol	Toluène
tp	Température pièce
<i>trans</i>	De l'autre côté
TrNOE	<i>Transferred nuclear Overhauser effect</i>
Trp	Tryptophane
Tys ou Tyr·SO₃	Tyrosine sulfatée
Tyr	Tyrosine
μ	Micro
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier le Professeur Yvan Guindon de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire de chimie bio-organique à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Ces trois années furent très enrichissantes et m'ont donné l'occasion de me développer en tant que chimiste et j'en suis très reconnaissante. Je retiendrai surtout votre sens de l'humour, dont vos blagues et vos anecdotes, car il n'y a rien de mieux qu'un superviseur souriant et positif afin de nous motiver. Merci pour tout.

Je me dois de remercier nos deux chercheurs associés actuels, Dr Michel Prévost et Dr. Starr Dostie qui sont toujours là pour répondre à nos multiples questions. Starr, même si on ne se sera pas côtoyé bien longtemps, je te souhaite le meilleur avec ta petite famille. Je tiens aussi à remercier tous les membres passés et présents du laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer (François Godin, Carla Eymard, Guillaume Tambutet, Marc-Olivier, David Clément, Garrett Freure, Scott Foster, Amarender Manchoju, Élodie Hardine, Laura Jean).

Un remerciement spécial pour le Dr Philippe Mochirian, ancien chercheur associé, qui fut mon superviseur lors de mon stage d'été avant le début de ma maîtrise. Tu m'auras fait beaucoup rire, m'auras beaucoup appris sur la chimie et je fus très attristée de ton départ au début de ma maîtrise. Merci pour tous tes conseils et tous les fous rires.

Quelques membres du laboratoire méritent aussi un remerciement spécial. En premier, Louis Leblanc, avec tes danses, tes plaisanteries et tes insultes gratuites, tu m'auras fait rire et décompresser tout au long de mes deux premières années de maîtrise. Puis Tommy Lussier, la personne la plus intelligente que je connaisse. Merci d'avoir été mon encyclopédie, je ne sais

pas comment je vais faire sans mon voisin de hotte qui connaît tout et qui répond à chacune de mes questions avec patience. Et Ryan Simard, ton sens de l'humour et ta zénitude vont me manquer. À qui vas-tu lancer de la glace sèche quand je ne serai plus là?

Merci Laura Gillard pour ton amitié, tes conseils et je te suis très reconnaissante de m'avoir épaulée lors de ma recherche d'emploi et de m'avoir référencé auprès de ton employeur, qui est maintenant notre employeur. Je sais qu'un jour ou l'autre tu retourneras en France, mais j'espère te garder au Québec le plus longtemps possible.

Je veux remercier mes amis, sans qui ce parcours difficile qu'est une maîtrise en chimie n'aurait jamais été possible. Merci à la personne la plus gentille, la plus aimante et la plus formidable que je connaisse, Éliane Dion-Saindon, d'être dans ma vie. Même si nos horaires sont chargés et qu'on ne se voit plus autant qu'avant, tu gardes toujours une grande place dans mon cœur. En même temps je dois remercier tous les autres Chamblyens (Véronique Dubé, Rémi Bertrand, Marianne Bertrand, Christian Joudrey, Yan Chouinard et Isabelle Tittley) pour toutes les belles soirées passées en votre compagnie. Un jour, je l'espère, je vous rejoindrai à Chambly. Merci à Tanya-Claudia Caron de m'avoir accueilli chez toi tout au long de ma maîtrise. Nos longues conversations dignes d'une séance chez le psychologue vont beaucoup me manquer maintenant que je quitte la coloc pour voler de mes propres ailes.

Finalement, je ne peux passer sous silence l'aide précieuse de mes parents qui m'ont permis d'être où je suis à ce jour. Vous êtes les meilleurs parents du monde, vous pensez toujours à vos deux enfants avant vous et même si je ne le dis pas assez souvent, j'en suis consciente et je vous aime très fort.

1. Introduction

1.1. L'inflammation

L'inflammation aigüe est un mécanisme de défense naturel du système immunitaire en réponse à une agression comme une infection ou une allergie. Ce processus biologique vise à éliminer l'agresseur et à réparer le tissu endommagé et est donc considéré comme essentiel. Malheureusement, il arrive que la réponse inflammatoire soit excessive ou désordonnée, ce qu'on qualifie alors d'inflammation chronique. Celle-ci est une composante importante de plusieurs maladies ou conditions qui affectent grandement la population comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'asthme, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques et les occlusions vasculaires. Dans les deux derniers cas, les traitements actuels sont insatisfaisants tant par leur efficacité que par leurs effets secondaires sérieux. Ainsi, il est nécessaire de trouver de nouveaux médicaments efficaces et sécuritaires pour traiter ces conditions.

1.1.1. Maladies inflammatoires chroniques

La maladie inflammatoire chronique est une condition médicale qui inclue plusieurs maladies comme les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, psoriasis, lupus), le syndrome métabolique, les maladies neurodégénératives, la maladie obstructive chronique, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les maladies cardiovasculaires.¹ Lors des trois dernières décennies, la population affectée de maladies inflammatoires chroniques n'a fait qu'augmenter et il est documenté que les ces derniers sont la principale cause de décès dans le monde.² De plus, il est prédit que la mortalité associée à cette condition continuera d'augmenter,

et qu'en 2030, un estimé de 171 millions de personnes en serait affecté, et ce, seulement aux États-Unis.³

1.1.2. Traitements existants

La plupart des traitements actuels sont divisés en deux grandes familles, soit les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Les premiers sont des dérivés du cortisol et de la cortisone, qu'on appelle glucocorticoïdes, et qui inhibent la phospholipase A₂ et ainsi la synthèse de l'acide arachidonique. Ce dernier est un précurseur de médiateurs importants de l'inflammation, soit les prostaglandines et les leucotriènes. Une inhibition de la production de ceux-ci a pour effet de limiter l'inflammation. Pour ce qui est des AINS, ceux-ci inhibent les cyclooxygénases (COX), qui transforment l'acide arachidonique en prostaglandines (Figure 1). Les anti-inflammatoires peuvent aussi agir à d'autres niveaux de cette cascade. Par exemple, Zeuliton⁴ est une drogue utilisée par les patients atteints d'asthme et qui permet d'inhiber la 5-lipoxygénase. Ceci inhibe la formation du leucotriène LTB₄, un chimioattractant important de la réponse inflammatoire.⁵

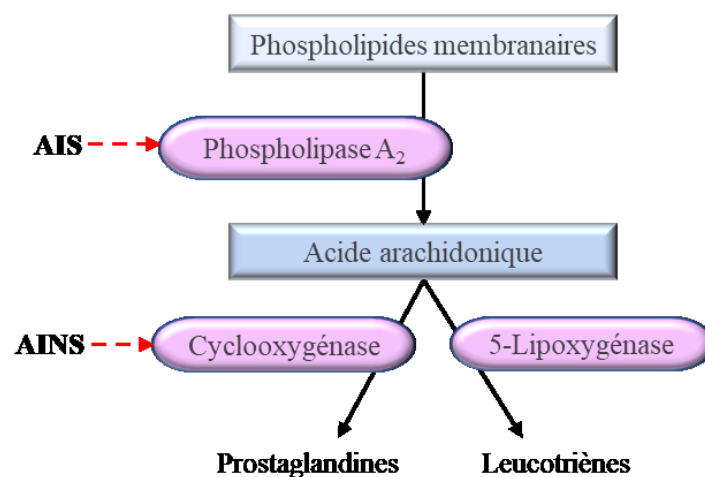


Figure 1. Cascade de l'acide arachidonique et où agissent les AIS et les AINS⁶

Les AINS, plus largement utilisés, sont efficaces pour soulager la douleur causée par l'inflammation, mais sont associés à environ 15 000 décès et plus de 100 000 hospitalisations par année aux États-Unis. Ceci est principalement dû à des complications gastro-intestinales, un effet secondaire important de ces médicaments.⁷ Pour ces raisons, il est important de trouver de nouveaux agents pouvant agir contre l'inflammation de façon efficace, mais aussi de façon sécuritaire.

Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été investis afin de trouver une nouvelle approche pour lutter l'inflammation chronique. Tandis que les anti-inflammatoires traditionnels ciblent l'inhibition de la synthèse de médiateurs de l'inflammation, une nouvelle méthode serait d'agir directement sur le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation. Les sélectines sont une cible de choix puisqu'elles sont impliquées dans l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.

1.2. Le processus inflammatoire

Le processus inflammatoire se déclenche lorsque l'organisme subit une agression physique, biologique ou chimique et est caractérisé par de la douleur, de la rougeur, de l'enfllement et de la chaleur. L'organisme, à l'aide d'une série de réactions complexes, tente de restaurer le tissu touché à son état initial. Entre autres, le processus inflammatoire permet, à l'aide de médiateurs chimiques, la vasodilatation des vaisseaux sanguins ainsi que l'augmentation de leur perméabilité. La vasodilatation augmente le flux de leucocytes et autres cellules utiles à la réparation du tissu, tandis que l'augmentation de la perméabilité permet la migration de ces cellules au site d'inflammation.

1.3. Sélectines et leurs ligands

Les sélectines sont les principaux initiateurs du recrutement des leucocytes dans le sang jusqu'au foyer de l'inflammation. La famille des sélectines sont réparties en trois groupes, soit les sélectines E, les sélectines P et les sélectines L. Ce sont des protéines transmembranaires qui sont situées sur la membrane plasmique des cellules endothéliales (sélectines E et P), les plaquettes sanguines (sélectines P) et les lymphocytes (sélectines L). Elles possèdent toutes les trois un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone de type lectine, un domaine équivalent au facteur de croissance épidermique « EGF-like », ainsi qu'un nombre varié d'unités répétitives. (Figure 2) Afin d'alléger l'information, il sera discuté majoritairement des sélectines endothéliales E et P pour lesquelles nous avons un intérêt particulier.

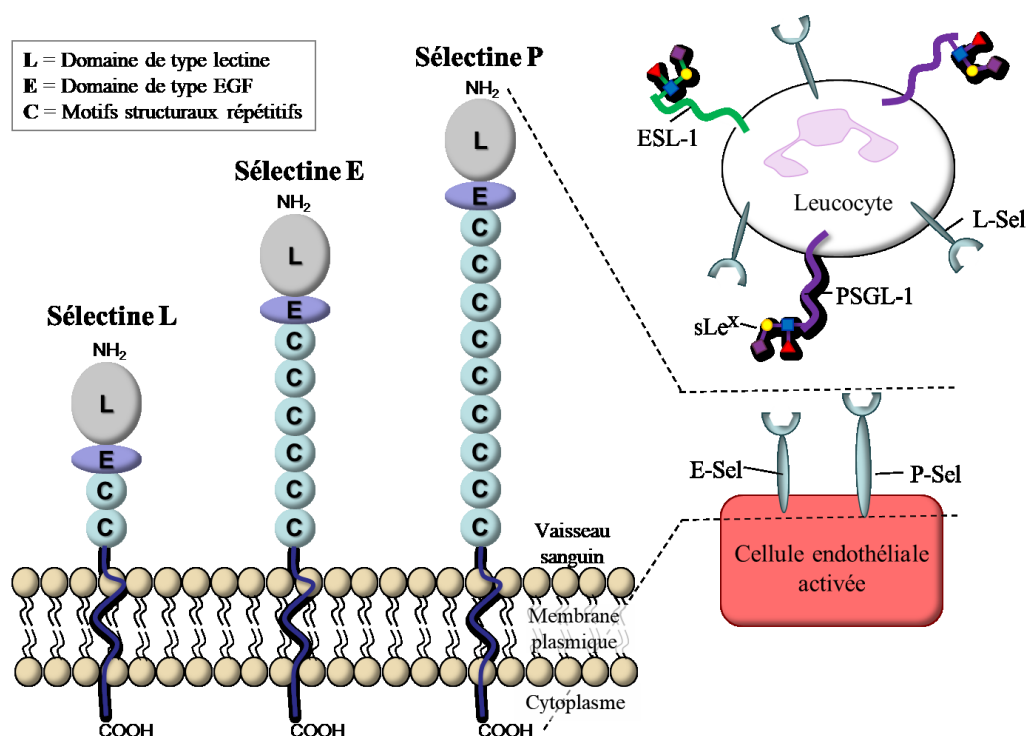


Figure 2. Structure et emplacement des sélectines et leurs ligands

Lorsque l'inflammation est déclenchée, il y a sécrétion de cytokines telles que les interleukines 1 (IL-1), les facteurs de nécrose tumorale (TNF α) et autres chimiokines. Ces cytokines ont pour effet d'activer l'endothélium à proximité du site d'inflammation. Les cellules endothéliales activées permettent la migration à leur surface en quelques minutes de la sélectine P préalablement stocké dans des corps de Weibel-Palade. Cette activation permet aussi l'expression et la synthèse de la sélectine E en 3 à 6 heures.⁸ Les leucocytes en circulation dans le vaisseau sanguin peuvent alors interagir avec les cellules endothéliales puisqu'ils possèdent à leur surface les ligands des sélectines E et P soit, ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) et PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*). Le motif sialyl Lewis^x (sLe^x) présent sur ces ligands est reconnu par les sélectines et est à l'origine de leur interaction. La force de ces interactions dépend de la contrainte de cisaillement ou « shear stress » qui correspond à la friction exercée sur l'endothélium par le flux sanguin. Normalement, les leucocytes ont une interaction très faible avec les sélectines, mais il a été démontré que le temps de vie du complexe des sélectines avec leur ligands augmente avec le « shear stress » et la force de traction qui leur est appliqué.⁹⁻¹¹ Ceci a été expliqué par la transition d'une conformation courbée des sélectines à une conformation allongée lorsque ces forces sont appliquées.^{12,13} Ainsi, la déformation du complexe permet l'accès à une conformation démontrant une meilleure affinité.¹⁴ L'alternance de la liaison aux sélectines et du détachement crée un mouvement de roulement (Figure 3), ce qui est responsable du ralentissement des leucocytes sur la paroi endothéliale à proximité du foyer de l'inflammation.¹⁵ Une fois ralentis, les leucocytes s'immobilisent et migrent vers le tissu grâce à l'interaction forte d'autres molécules d'adhésion comme LFA-1 et VLA4 qui se lient respectivement à ICAM-1 et VCAM-1 présents sur les leucocytes.¹⁶

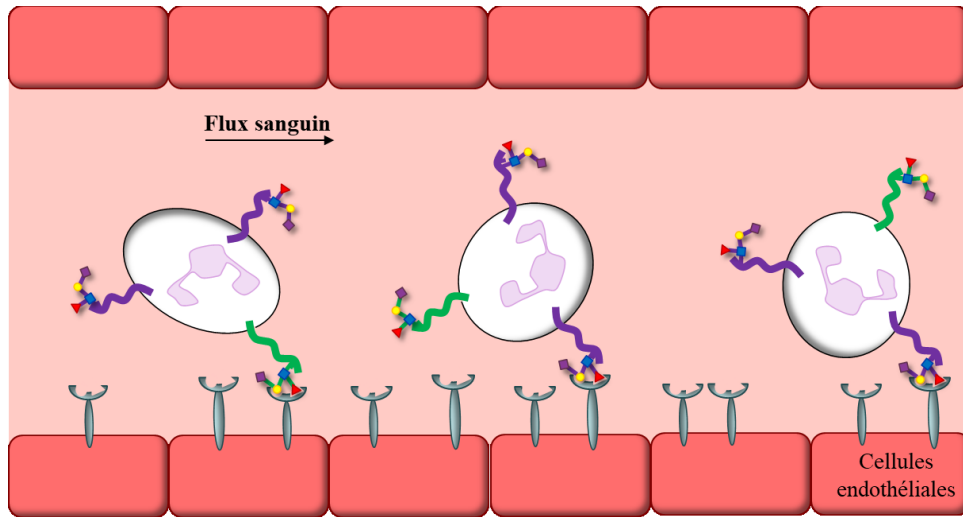


Figure 3. Roulement et ralentissement des leucocytes médiés par la faible interaction entre sLe^x et les sélectines E et P.

Il est à noter que les sélectines sont importantes dans cette cascade biologique, car elles en sont le point de départ. En effet, il a été démontré que les souris déficientes en sélectines E ont une diminution de 80% de leucocytes immobilisés lorsqu'un chimioattractant est injecté localement.¹⁷ Cette diminution est attribuée au fait qu'en absence de la sélectine E, qui est responsable du ralentissement des leucocytes, ceux-ci roulent trop vite pour s'immobiliser et s'insérer entre les cellules endothéliales.¹⁸

1.4. Sialyl Lewis^X

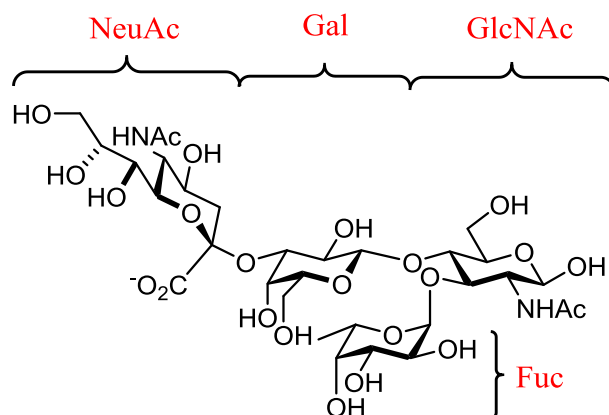
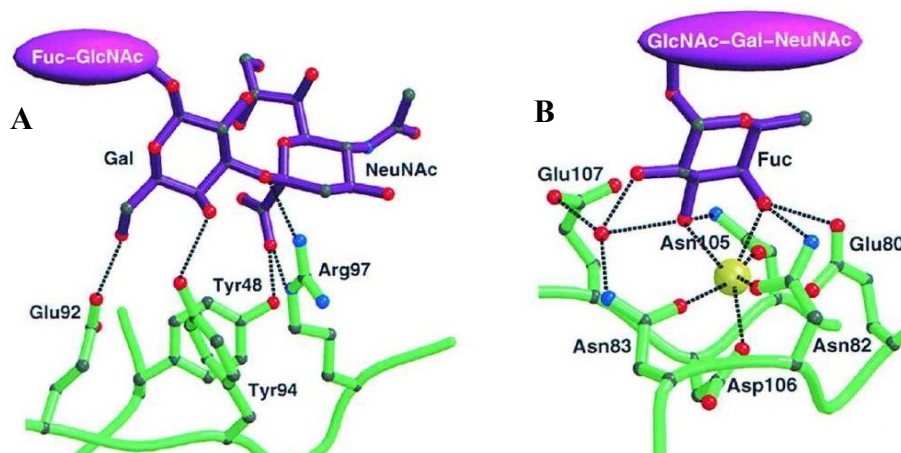


Figure 4. Structure du sLe^X

Le sLe^X (Figure 4) est un tétrasaccharide composé des unités L-fucose (Fuc), N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc), D-galactose (Gal) et acide N-acétyl-D-neuraminique (NeuAc). Il est le motif carbohydate qui est reconnu par les trois sélectines et qui est attaché à ESL-1 et PSGL-1 par la position anomérique du résidu GlcNAc. Ainsi, il permet la liaison entre les leucocytes en circulation et les sélectines à la surface des cellules endothéliales. Plusieurs études comme l'élucidation de la relation structure-activité (*SAR*),¹⁹⁻²² des études RMN des effets Overhauser nucléaire et de transfert de magnétisation (trNOE-RMN),²³⁻²⁶ des études RMN de *saturation-transfer difference* (STD-RMN),²⁷ des études de mutations,²⁸ des simulations de dynamique moléculaire^{29,30}, des études de thermodynamiques³¹ et finalement de la cristallographie aux rayons X^{32,33} ont permis de déchiffrer le site de liaison de sLe^X sur les sélectines.

1.4.1. Interaction sLe^X/E-LE ou sLe^X/P-LE

Les interactions entre le sLe^X et les domaines lectine/EGF de la sélectine E (E-LE) et de la sélectine P (P-LE) ont été élucidés par diffraction de rayons X.³³ La liaison de sLe^X avec E-LE est illustrée à la figure 5. Pour les deux sélectines, le 4-OH et le 6-OH du galactose font des ponts hydrogènes respectivement avec Tyr94 et Glu92 alors que l'acide carboxylique de NeuAc interagit avec Tyr48 (Figure 5A). Seulement pour P-LE, le 4-OH du résidu NeuAc profite d'un pont hydrogène avec Ser99. De son côté, E-LE bénéficie d'interactions favorables entre Arg97 et l'oxygène glycosidique et le carboxylate de NeuAc. Pour le fucose (Figure 5B), on observe que le 2-OH ne participe pas à une liaison hydrogène avec un résidu de la sélectine E ou P. Cependant, pour E-LE, il interagit indirectement avec Glu107 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Les 3-OH et 4-OH du fucose sont tous deux coordonnés à l'atome de calcium. De plus, le 3-OH fait une liaison hydrogène avec Asn105 alors que le 4-OH possède des interactions avec Glu80 et Asn82.



1.4.2. Interaction PSGL-1/Sélectine P

PSGL-1 profite d'une affinité pan-sélectine, c'est-à-dire qu'il se lie aux trois sélectines. C'est le motif sLe^X sur PSGL-1 qui permet d'être reconnu par les trois différentes sélectines. Cependant, une sulfatation du polypeptide N-terminal de PSGL-1 est aussi requise afin de pouvoir se lier aux sélectines P et L.^{34,35} En effet, la sélectine P bénéficie d'un second site d'interaction avec PSGL-1 lorsque les trois tyrosines du ligand Tyr46, Tyr48 et Tyr51 sont sulfatées (Figure 6).

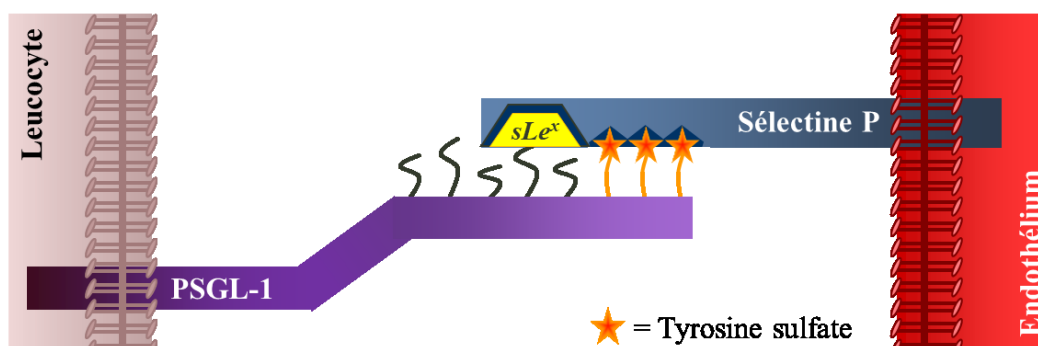


Figure 6. Liaison de PSGL-1 à la sélectine P par l'interaction du tétrasaccharide sLe^X et des tyrosines sulfates

Afin d'étudier ce mode de liaison, P-LE a été co-cristallisée avec le glycosulfopeptide SGP-3. Ce dernier contient 19 acides aminés N-terminaux de PSGL-1 dont les trois résidus tyrosine sulfatés (Tys 5, Tys7 et Tys10 dans SGP-3) ainsi que le glycane comportant sLe^X attaché à Thr16. Il est observable que l'interaction SGP-3/P-LE résulte à la fois de contacts hydrophobiques et électrostatiques. La portion anionique de SGP-3 comportant les tyrosines sulfates se lie à une région de potentiel électrostatique positif de P-Le. De son côté, la portion sLe^X se lie dans une zone de potentiel électrostatique neutre et négatif. (Figure 7)

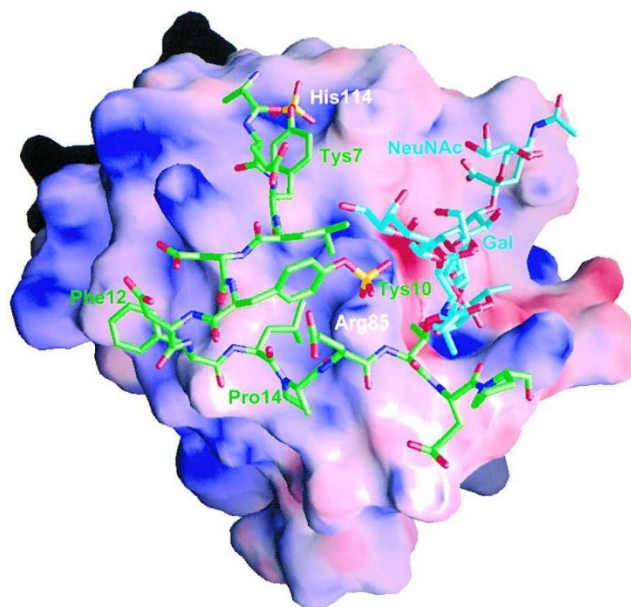


Figure 7. Surface électrostatique de la P-LE lié à SGP-3³³

En regardant de plus près les interactions entre P-LE et les sulfotyrosines de SGP-3, on observe que seulement Tys7 et Tys10 interagissent avec le domaine lectine. Les trois oxygènes du sulfate de Tys7 font des ponts hydrogènes directement ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau avec des résidus de P-LE (Figure 8A). Tys7 fait aussi un pont hydrogène par le carbonyle de son squelette peptidique avec l'amine du squelette peptidique de Lys112. Quant à Tys10, elle possède une liaison hydrogène avec Arg85 (Figure 8B). L'importance des deux sites de liaison des sulfotyrosines pour l'affinité PSGL-1/P-selectin a été démontrée par la perte de liaison lorsque les trois tyrosines sont remplacées par des phénylalanines.³⁶

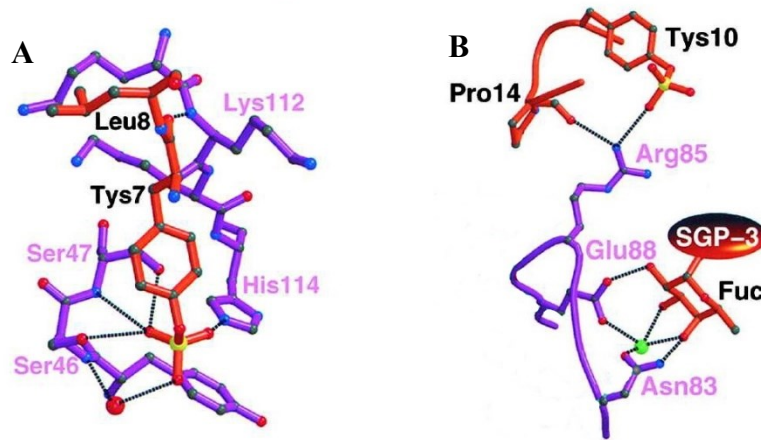


Figure 8. Interactions importantes pour la liaison des sulfotyrosines de SGP-3 à P-LE

1.5. Antagoniste des sélectines

1.5.1. Implication des sélectines dans certaines pathologies

Comme il a été vu précédemment, l'interaction entre les sélectines et sLe^X présent sur les ligands ESL-1 et PSGL-1 est impliqué dans l'extravasation de cellules inflammatoires vers un site d'inflammation. Ce processus, quoiqu'essentiel à un système immunitaire fonctionnel, peut rapidement devenir problématique pour certaines situations. Par exemple, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et l'asthme se caractérisent respectivement par une accumulation excessive des cellules inflammatoires dans la membrane synoviale des articulations, la peau et les voies respiratoires.

Les sélectines sont aussi impliquées dans le cancer. En effet, les cellules cancéreuses se caractérisent souvent par une altération de la glycosylation à leur surface.^{37,38} L'une de ses altérations est l'hypersialylation causé par la surexpression de sialyltransférases.^{39,40} Ainsi, les glycoprotéines à la surface des cellules cancéreuses possèdent le motif sLe^X permettant la

reconnaissance des sélectines.⁴¹ C'est en tirant avantage du même processus d'extravasation des leucocytes que les cellules cancéreuses parviennent à migrer vers des tissus inflammés (Figure 9) et se propager vers de nouveaux organes, menant à des cancers métastatiques. L'implication des sélectines dans le roulement des cellules cancéreuses sur la paroi endothéliale activée a été démontré par plusieurs études biologiques. Par exemple, pour un modèle de type xénogreffe de cancer du poumon à petites cellules, le roulement des cellules cancéreuses a effectivement été observé sur la paroi des vaisseaux sanguins traités avec du facteur de nécrose tumorale (TNF α) induisant de l'inflammation.⁴² De plus, suite une transplantation de cellules cancéreuses, les souris déficientes en sélectines E et P ont montré un nombre significativement plus bas de métastases par rapport aux souris de type sauvages. Il a aussi été observé *in vitro* que la lignée cellulaire hautement métastatique du cancer du sein ZR-75-1 a une affinité accrue avec la sélectine E par rapport à la ligné MCF1 reconnue comme étant moins métastatique.⁴³ Au-delà de leur rôle au niveau de l'extravasation des cellules cancéreuses, les interactions sélectines/ligands sont aussi associé à la formation d'embolie, la formation d'un microenvironnement propice à la métastase ainsi que la rétention des cellules cancéreuses dans leur niche tumorale.⁴⁴

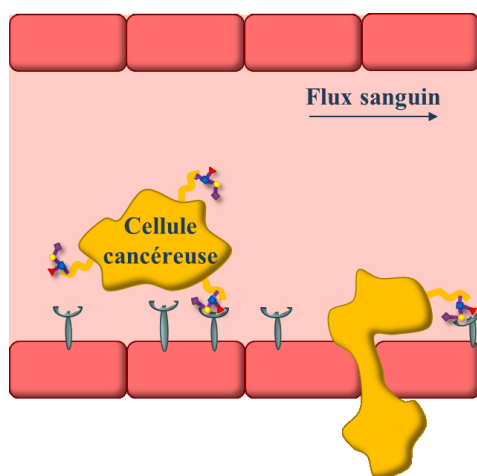


Figure 9. Implication des sélectines dans l'extravasation des cellules cancéreuses

D'autre part, les patients atteints de la drépanocytose (aussi appelé anémie falciforme) sont fréquemment aux prises avec des crises vaso-occlusives (CVO) très douloureuses qui sont aussi associés aux sélectines (Figure 10).^{45,46} Cette maladie se caractérise par la substitution d'une base dans le gène encodant la sous-unité β de l'hémoglobine menant à l'introduction d'un acide aminé différent sur sa chaîne peptidique. C'est cette mutation qui est responsable du changement des propriétés de l'érythrocyte, qui devient rigide et adopte une forme allongée. Parmi les événements menant à une CVO, l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale semble jouer un rôle des plus important. En effet, lorsque le leucocyte adhère fermement à l'endothélium grâce à, entre autres, des interactions sélectines/ligands, il commence à produire des intégrines nommées Mac-1 à sa surface.⁴⁷ Les érythrocytes falciformes possèdent un ligand non identifié qui interagit avec Mac-1.⁴⁸ L'adhésion des leucocytes avec les érythrocytes et même avec les plaquettes, crée une accumulation, puis finalement un blocage du vaisseau sanguin appelé occlusion vasculaire. Ceci entraîne une hypoxie tissulaire, ce qui est très douloureux et dangereux.

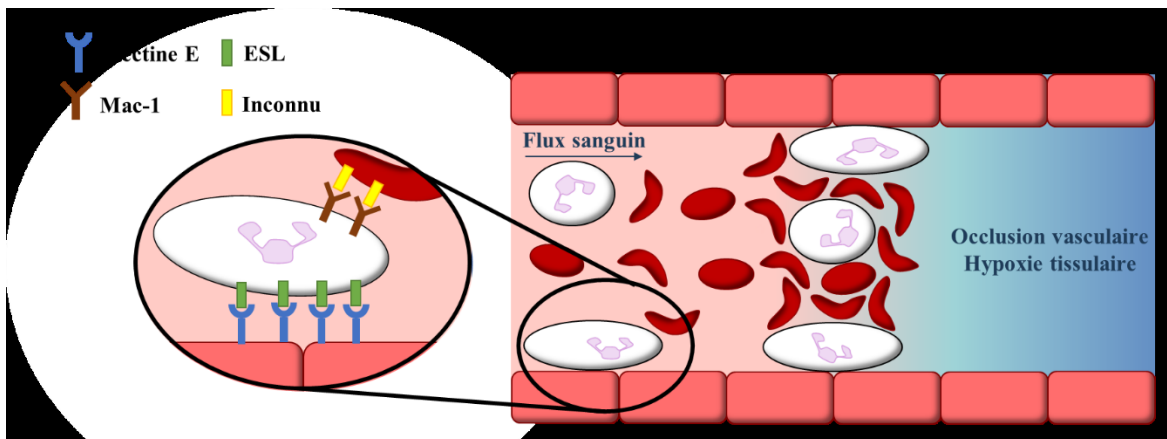


Figure 10. Implication des sélectines et autres molécules d'adhésion dans les crises vaso-occlusives chez les patients atteints d'anémie falciforme⁴⁷

1.5.2. Modulation de l'activité des sélectines

L'implication de l'interaction entre les sélectines et leurs ligands dans ces pathologies témoigne du réel besoin de trouver un moyen de contrer leur effet d'adhésion. Les principales stratégies ayant été développées sont la modulation de l'activité des sélectines par le clivage du ligand, l'inhibition de l'expression des sélectines et l'inhibition directe de la liaison sélectine/ligand.^{49,50}

La première de ces stratégies a été étudiée par des chercheurs de Genetics Institute qui ont démontré le potentiel d'utiliser la métalloprotéinase mocoarhagin provenant du venin de cobra. En effet, cette dernière permet de cliver un peptide de 10 acides aminés sur le N-terminus de PSGL-1, ce qui empêche la liaison de PSGL-1 aux sélectines.⁵¹

La seconde stratégie intervient au niveau de l'inflammation par l'inhibition de l'expression des sélectines. Parmi ces inhibiteurs, on retrouve des petites molécules non glucidiques comme les déazapurines brevetés par Eisai Co. Ltd.⁵² et des dérivés d'isoflavone⁵³. L'utilisation de nucléotides peut aussi permettre l'inhibition de l'expression des sélectines. L'Université Eberhard Karls a décrit l'utilisation de molécules d'acide nucléique, soit des constructions génétiques ou des siRNA qui ont permis d'inhiber l'expression de la sélectine E ainsi que de ICAM et VCAM lors de tests *in vitro*.⁵⁴

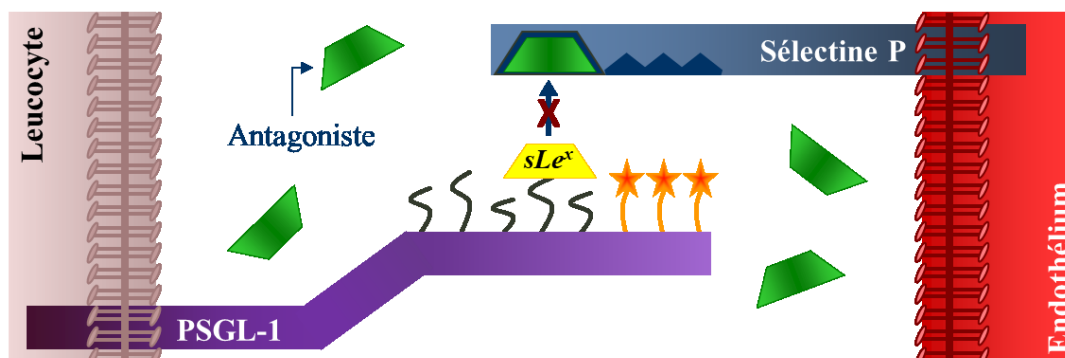


Figure 11. Un antagoniste en compétition avec les ligands naturels des sélectines

Finalement, la stratégie la plus utilisée est le design d'antagoniste des sélectines pouvant bloquer directement l'interaction sélectine/ligand. Le principe est de trouver des antagonistes qui ont une meilleure affinité avec les sélectines que les ligands naturels afin d'être en compétition avec la liaison des leucocytes (Figure 11). Il existe différentes catégories d'antagonistes, soit les hydrates de carbone, les mimétiques d'hydrates de carbone, les molécules à basse et à haute masse moléculaire non glucidiques, les peptides, les anticorps et les aptamères.⁴⁹ Bien que le sLe^X natif ne soit pas en lui-même un inhibiteur efficace,⁵⁰ l'utilisation d'hydrates de carbone reste l'une des approches la plus viable et la plus étudiée comme inhibiteurs des sélectines. Des chercheurs de l'Université de Californie^{55,56} ainsi que ParinGenix⁵⁷ ont étudié l'utilisation de dérivés d'héparine afin d'inhiber l'interaction avec les sélectines, tout en minimisant l'effet anticoagulant. D'autre part, le glycomimétique bimosiamose (Figure 12) est un dimère de dérivés du mannose en développement par Revotar qui a démontré un potentiel d'utilisation pour plusieurs conditions comme l'asthme, le psoriasis et les lésions d'ischémie-reperfusion, mais qui inhibe seulement l'interaction avec les sélectines E.^{58,59} Finalement, la synthèse de mimétiques du sLe^X occupe une grande place dans la recherche d'inhibiteurs glucidiques des sélectines. Malheureusement, leur utilisation reste limitée en raison de leur faible activité ou leur toxicité.⁶⁰ Par exemple, Rivipansel (Figure 12), un mimétique de sLe^X a démontré son efficacité en essai clinique pour le traitement des crises vaso-occlusives chez les patients atteints d'anémie falciforme, mais le traitement requiert une infusion d'environ 2 grammes par jour due à sa faible affinité envers la sélectine P.⁶¹

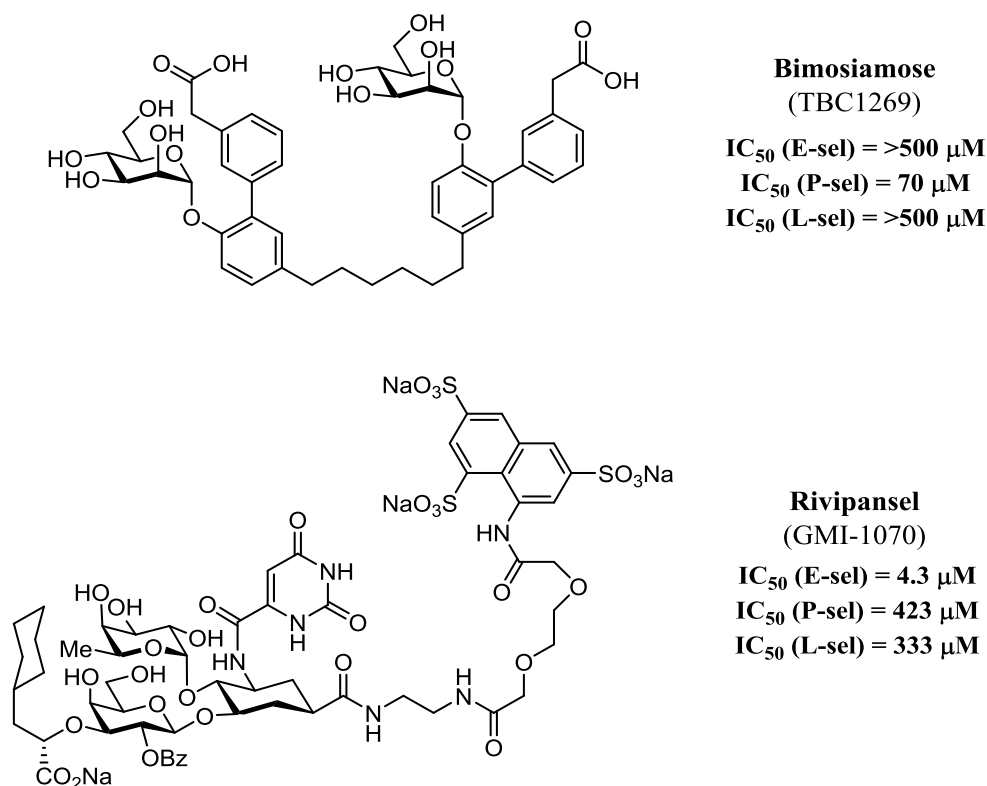


Figure 12. Structure et activité de Bimosiamose et Rivipansel

Bien que toutes ces recherches sur l'inhibition sélectines/ligands aient menés à l'obtention de médicaments potentiels, aucun de ceux-ci n'est pour le moment sur le marché. Ainsi, l'obtention de nouveaux antagonistes des sélectines efficaces reste un sujet d'actualité. Un désavantage bien connu des hydrates de carbone dans le design de médicaments est leur instabilité métabolique dans un milieu physiologique.⁶² Ainsi, les médicaments à base d'hydrates de carbone ne résistent pas milieu acide et leur administration doit plutôt se faire par injection intraveineuse. Ce mode d'administration n'est pas idéal à long terme ou à domicile et c'est pourquoi les applications des mimétiques de sLe^X sont limitées aux interventions en hôpital. Parmi ces applications, on retrouve la crise vaso-occlusive et la chirurgie d'ablation de

tumeur cancéreuse. L'injection intraveineuse de la drogue à un patient faisant une crise vaso-occlusive pourrait permettre de briser l'occlusion, alors qu'un patient qui subit une chirurgie d'ablation pourrait recevoir la drogue afin de diminuer les risques de métastase.

En passant par un bref rappel des notions de la chimie des hydrates de carbone (Chapitre 2), ce mémoire décrit la conception et la synthèse de nouveaux mimétiques du sLe^X basées sur les travaux effectués auparavant par d'autres groupes de recherche ainsi que sur les travaux d'anciens membres de notre groupe (Chapitre 3). Suite à la synthèse d'une première génération de mimétiques du sLe^X ayant une activité biologique intéressante⁶³, mes travaux relatent la synthèse d'une seconde génération d'analogues qui tireraient avantage du second site de liaison des tyrosines sulfates sur la P-sélectine en ajoutant une chaîne latérale qui incorpore un pharmacophore anionique (Chapitre 4). Les analyses biologiques de cette deuxième génération d'analogues seront discutées. Trois types de tests furent utilisés, soit un test d'adhésion en milieu dynamique *in vitro*, un test d'adhésion en milieu statique *in vitro* et un test d'inflammation péritonéale *in vivo* (Chapitre 5). Finalement, les efforts préliminaires en vue de l'obtention de différents analogues amides seront aussi brièvement introduits (Chapitre 6).

2. Chimie des hydrates de carbone

2.1. Introduction

Les hydrates de carbone sont les produits naturels les plus abondants dans la nature et sont fondamentalement constitués d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Historiquement, la formule générale du monosaccharide s'écrivait en $C_x(H_2O)_y$,⁶⁴ ce qui leur a valu le nom d'hydrates de carbone. Ces derniers sont une famille de molécules biologiques qui est constituée des monosaccharides, des disaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides. Les hydrates de carbone sont présents dans une variété d'aliments (amidon, glycogène, saccharose, lactose, glucose, fructose, etc.)⁶⁵ et jouent un rôle très important dans l'organisme vivant. En effet, certains polysaccharides comme l'amidon et le glycogène servent à entreposer de l'énergie dans les cellules. D'autres comme la cellulose, la pectine et le xylane jouent un rôle structural chez les plantes, alors que la chitine est la composante majeure de l'exosquelette d'insectes, homards et crabes.⁶⁶ Aussi, les hydrates de carbone sont d'importants composants de plusieurs fonctions biologiques comme la reconnaissance cellulaire⁶⁷, la fertilisation, le développement neuronal, l'embryogenèse, l'activité hormonale, l'infection bactérienne, la métastase de cellules cancéreuses et plusieurs autres.⁶⁸ Ceci n'est que quelques exemples de leur vaste utilité et de leur importance biologique.

2.2. Généralités, nomenclature et structure des hydrates de carbone

Les mono-, di-, et les petits oligosaccharides, sont fréquemment appelés « sucres ». Les aldohexoses sont les sucres composés de 6 carbones, dont les plus abondants dans la nature sont le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose. La configuration D ou L est basée sur l'orientation de l'hydroxyle en position 5 (Figure 13).

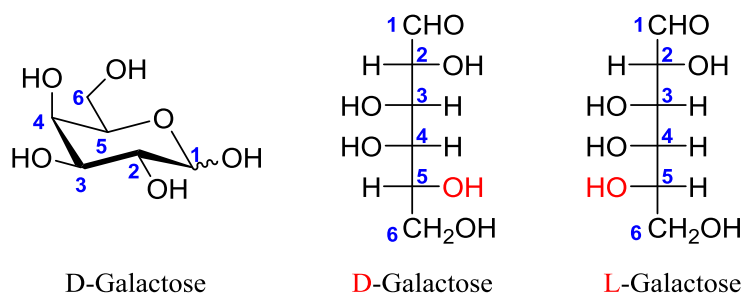


Figure 13. Numérotation du galactose et appellation D/L

En plus de la nomenclature D et L, il existe une annotation spécifique pour la stéréochimie du carbone anomérique. Un sucre est en équilibre entre sa forme ouverte et sa forme cyclique. Le carbone en position 1, appelé carbone anomérique, n'a pas de chiralité dans la forme ouverte, mais la formation de l'hémiacétal cyclique par l'attaque de l'hydroxyle en position 5 sur l'aldéhyde produit un nouveau carbone asymétrique. Ainsi, selon la stéréochimie du carbone anomérique, on attribue la nomenclature α ou β . On nomme α lorsque l'hydroxyle anomérique est dans le sens inverse du CH_2OH en C5 et β s'ils sont du même côté (Figure 14).

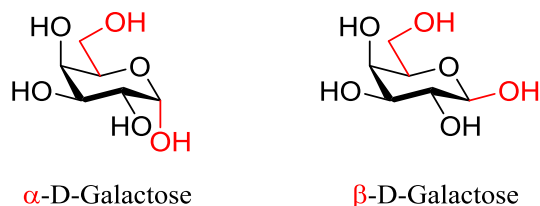


Figure 14. Nomenclature α/β

Un défi bien connu en synthèse avec des hydrates de carbone est la présence de plusieurs hydroxyles qui ne sont pas facilement différenciables. Ceci est surtout vrai pour les hydroxyles secondaires en C2, C3 et C4. En effet, l'hydroxyle en position anomérique (C1) possède une réactivité différente des autres hydroxyles puisqu'il fait partie d'une fonction hémiacétale. De plus, l'hydroxyle C6 peut parfois être différencié puisque c'est un alcool primaire. Cette particularité rend nécessaire l'utilisation orthogonale de groupements protecteurs, ce qui augmente la complexité de la synthèse.

2.3. Effet anomère

La conformation préférée d'un cycle à 6 carbones, à l'instar des dérivés du cyclohexane, est souvent dictée par la présence d'un substituant qui sera davantage stable en position équatoriale pour diminuer les effets stériques. Cependant, il faut noter que c'est différent pour les pyranoses, puisqu'un groupement en position anomérique adoptera préférentiellement une orientation axiale. Cette observation a été faite pour la première fois par Edward⁶⁹ et a été nommée «l'effet anomérique» par Lemieux et Chũ⁷⁰. Il existe plusieurs théories pour expliquer cette préférence axiale, mais l'une des plus acceptées repose sur le recouvrement orbitalaire stabilisant. En effet, dans le cas de l'anomère α , le doublet non liant (n) de l'oxygène

exocyclique est aligné avec l'orbitale σ^* de la liaison C-O ($\sigma^* \text{ C-O}$) endocyclique, ce qui permet une interaction stabilisante. De plus, le doublet non liant de l'oxygène endocyclique offre une seconde interaction stabilisante puisqu'il est aligné avec l'orbitale σ^* de la liaison C-O ($\sigma^* \text{ C-O}$) exocyclique. L'anomère β , quant à lui, ne possède qu'une seule de ces interactions, puisqu'il n'y a aucun alignement possible pour avoir un recouvrement entre l'oxygène endocyclique avec l'orbitale σ^* de la liaison C-O ($\sigma^* \text{ C-O}$) exocyclique. Cet anomère est donc globalement moins stable (Figure 15).

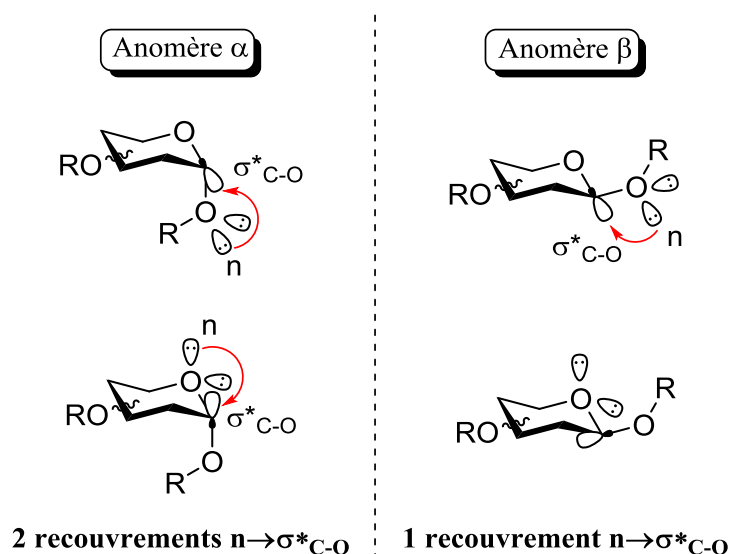


Figure 15. Recouvrements orbitaux expliquant l'effet anomérique

2.4. La glycosylation

La *O*-glycosylation est une réaction généralement utilisée pour coupler un saccharide à un autre. Ainsi, la synthèse de polysaccharide repose entièrement sur la formation des liens glycosidiques, ce qui en fait l'une des réactions la plus documentée dans la chimie des hydrates de carbone. La *O*-glycosylation met en jeu un donneur de glycosyle possédant un groupement

partant à sa position anomérique et un accepteur de glycosyle possédant un hydroxyle libre. Le donneur joue le rôle d'électrophile et l'accepteur de nucléophile. Cette réaction nécessite souvent la présence d'un promoteur qui favorise le départ du groupe partant (Schéma 1). La fonction alcool de l'accepteur peut provenir de différents types de molécules, et n'est donc pas nécessairement un sucre. Si l'accepteur n'est pas un sucre, on appelle plutôt cette réaction une glycosidation.

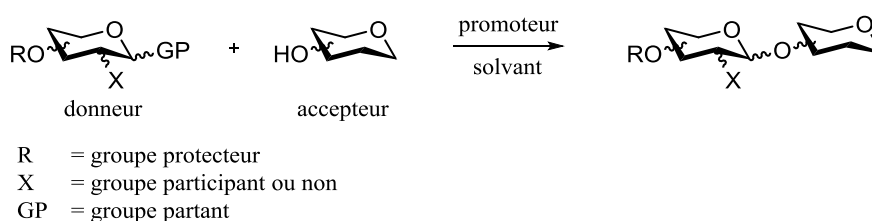


Schéma 1. Réaction de *O*-glycosylation

2.4.1. Formation de liens glycosidique de façon stéréosélective

L'obtention d'un lien glycosydique de façon hautement sélective est l'un des plus grands défis en synthèse de glycosides. Bien que le mécanisme de la *O*-glycosylation ne soit toujours pas élucidé complètement, il existe un mécanisme général qui est accepté au sein de la communauté scientifique⁷¹ (Schéma 2). Le donneur de glycosyle A est préalablement activé grâce à l'installation d'un groupement partant. Celui-ci réagit avec le promoteur en formant le complexe B. Ensuite, le départ du groupement partant, qui est l'étape limitante, génère un carbocation glycosyle existant sous sa forme de résonnance stabilisée, soit l'oxocarbénium C. La fonction alcool de l'accepteur peut alors attaquer par le haut ou par le bas, ce qui résulte en deux produits différents, soit l'anomère α et l'anomère β .

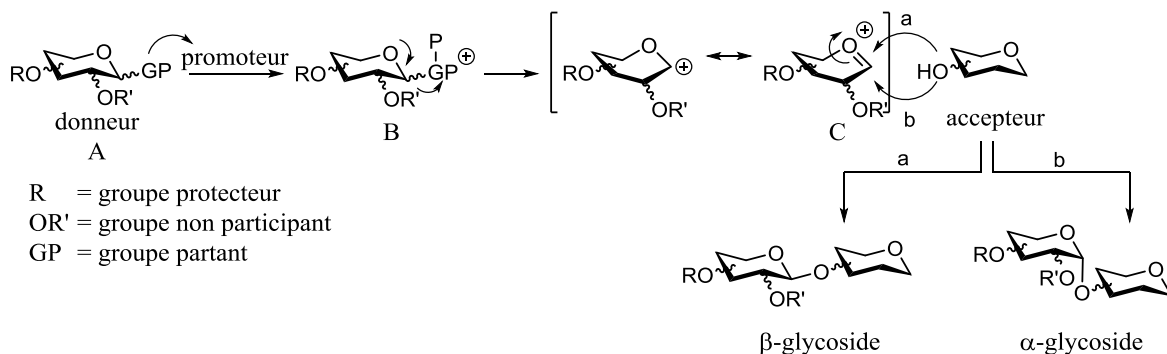


Schéma 2. Mécanisme général de la glycosylation en absence de groupement participant

Toutefois, la formation de l'oxocarbenium C n'a jamais pu être observée expérimentalement. Les réactions de glycosylation passeraient plutôt par des états de transitions avec le groupement partant plus ou moins associé, ce qui se situerait entre les voies S_N1 et S_N2 . Plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'étude du mécanisme de la glycosylation afin d'expliquer la sélectivité α et β . Crich^{72,73}, à l'aide d'études de l'effet isotopique cinétique primaire en ^{13}C a étudié les systèmes de β -Mannosylation. Il a démontré que la sélectivité repose sur plusieurs facteurs, dont la nature et l'orientation des groupements protecteurs sur les hydroxyles du donneur et la nature des paires d'ions formées lors de la réaction. Par exemple, le cas du mannose 4,6-benzylidène est décrit au schéma 3. Le β -mannoside résulte de l'addition du nucléophile sur la face du dessus lorsqu'il y a une paire d'ions de contacts. Le α -mannoside, quant à lui, provient d'une paire d'ions séparés par le solvant dont la face du dessous est attaquée puisqu'elle est moins encombrée. Dépendamment de la nature des substituant sur le donneur, on obtient une meilleure sélectivité β lorsque ceux-ci déstabilisent l'oxocarbenium, ce qui limite la formation de paires d'ions séparées par le solvant. Bref, les différents facteurs impliqués dans la glycosylation rendent difficile de prédire la sélectivité. Toutefois, il est possible de modifier

certaines paramètres afin de pouvoir contrôler la stéréochimie du lien glycosydique tels que la température, la pression, le solvant et la nature du groupement protecteur en C2.

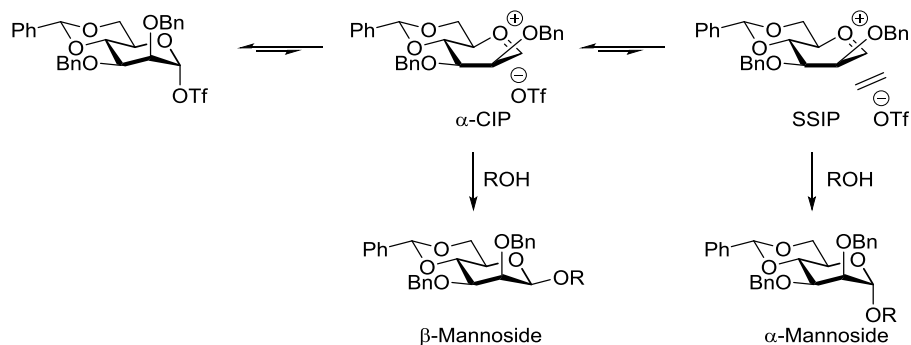


Schéma 3. Mécanistique de la formation d'un lien glycosidique α ou β pour le système mannose 4,6-benzylidène.

2.4.2. Assistance anchimérique

La nature du groupement protecteur de l'hydroxyle en C2 est très importante au niveau de la sélectivité du lien glycosydique, puisqu'il peut jouer un rôle dans sa formation. Plusieurs groupements protecteurs de nature esters comme les acétates, chloroacétates et benzoates participent à la formation du lien glycosydique en formant l'ion dioxolénium D (Schéma 4) comme intermédiaire le plus stable. Cette participation du groupement protecteur en C2 est appelée assistance anchimérique et est utilisée afin d'obtenir majoritairement des anomères β avec les sucres qui ont l'hydroxyle en C2 vers le bas. Ainsi l'intermédiaire D ne permet que l'attaque du nucléophile par la face du haut. En série mannose, par exemple, où l'hydroxyle pointe vers le haut, le produit majoritaire sera l'anomère α , puisque le groupement protecteur participant bloquera la face supérieure du sucre.⁷⁴

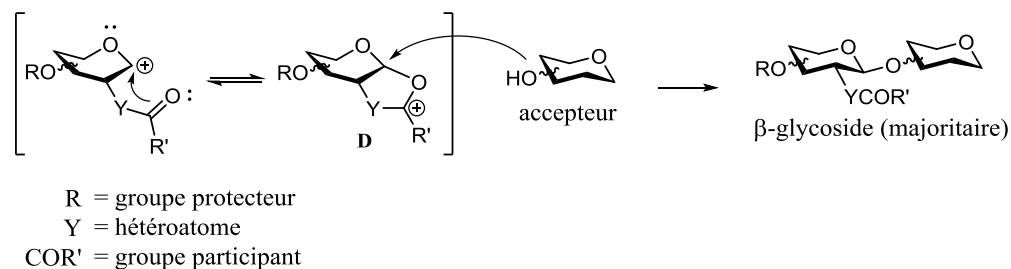


Schéma 4. Mécanisme général de la glycosylation avec assistance anchimérique (pour les sucres ayant l'hydroxyle en C2 vers le bas)

2.4.3. Méthodes de glycosylation

Due à sa complexité, la *O*-glycosylation stéréosélective a été largement étudiée et plusieurs méthodes basées sur différents donneurs de glycosyle ont été découvertes. Parmi eux, ont compte l'utilisation d'halogénures de glycosyles (bromures⁷⁵, iodures⁷⁶, fluorures⁷⁷), d'imidates de glycosyle^{78,79} et de thioglycosides⁸⁰⁻⁸². La méthode utilisée dans ce mémoire est celle utilisant les thioglycosides. Ces derniers ont l'avantage d'être assez stable pour introduire le groupement thioéther, qui sera le groupement partant, en début de synthèse. De plus, ils sont faciles à préparer et leur activation est douce et chimiospécifique.

Plusieurs promoteurs sont connus afin d'activer les thioglycosides. Ce sont souvent des agents électrophiles doux qui réagiront avec l'atome de soufre, lui-même un nucléophile doux, afin de générer un sulfonium. Celui-ci est un excellent groupe partant, ce qui favorise la formation de l'oxocarbenium. Parmi les promoteurs les plus utilisés, on retrouve NIS/TfOH,⁸³ NIS/TMSOTf⁸⁴ et DMTST⁸⁵. Le mécanisme de glycosylation avec NIS/TfOH est illustré au schéma 5. Le mécanisme d'activation généralement accepté⁸⁶ débute par la protonation d'un carbonyle du NIS par TfOH, puis est suivi la formation d'un ion iodonium. L'atome de soufre

en position anomérique attaque cet ion alors on se retrouve avec une espèce triflate de iodosulfonium qui favorise le départ de ISR' et la formation de l'oxocarbénium. L'hydroxyle libre de l'accepteur de glycosyle attaque en position anomérique, et ce, de façon stéréosélective pour l'anomère β s'il y a présence d'un groupement participant (comme Bz) ou encombrant en position 2 du donneur. De son côté, ISR' subit une dismutation pour former le disulfide correspondant $\text{R}'\text{SSR}'$ et du diiode.⁸⁷ De plus, TfOH est régénéré à la fin de la réaction, ce qui permet de l'utiliser en quantité catalytique.

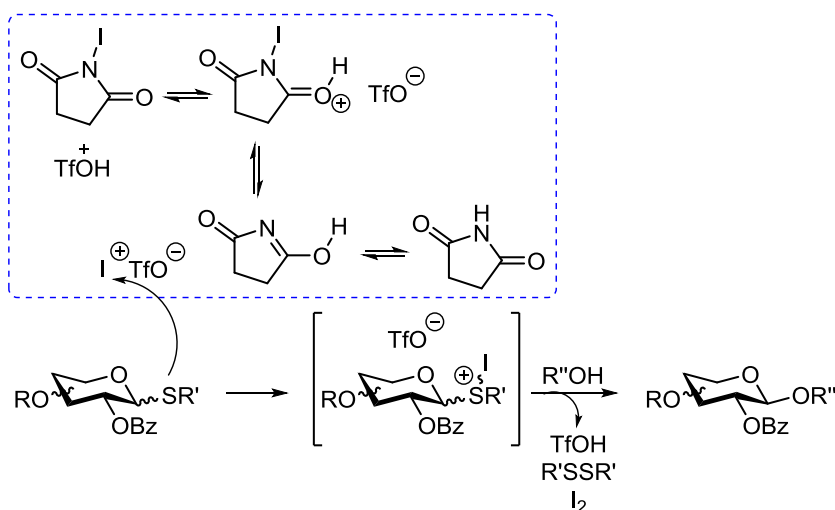


Schéma 5. Mécanisme de glycosylation par l'activation d'un thioglycoside par l'utilisation des promoteurs NIS/TfOH

3. Mimétiques du sialyl Lewis^X

3.1. Historique

C'est au début des années 1990 que les chercheurs commencent à s'intéresser à l'idée d'utiliser des mimétiques du sialyl Lewis^X comme antagonistes des sélectines. Afin de pouvoir élaborer des mimétiques du sLe^x, il est nécessaire de connaître la structure des sélectines, de leur ligand, ainsi que les interactions importantes impliquant le sLe^x. Pour ce faire, beaucoup de temps a été investi à l'élucidation de la structure tridimensionnelle du complexe sélectine-ligand. Ainsi, à l'aide de leurs études de relation structure-activité avec des sLe^x modifiés, Hasegawa²¹ et Gaeta²⁰ ont permis d'en apprendre beaucoup sur les pharmacophores importants pour la reconnaissance du sLe^x par les sélectines. Leur étude consistait à synthétiser des analogues en remplaçant de façon empirique les groupements fonctionnels par des hydrogènes et de tester leur activité (Section 3.2). Bien qu'importantes, ces études n'ont toutefois pas permis d'identifier toutes les interactions entre sLe^x et les sélectines. En effet, ce n'est qu'un peu plus tard en 2000 que la structure cristalline du sLe^x avec les sélectines E et P a été élucidée³³, permettant leur identification (Section 1.4).

3.2. Étude du pharmacophore du sialyl Lewis^X

3.2.1. Modification du résidu fucose

Lors des études d'Hasegawa et Gaeta, les analogues monodéoxy du résidu fucose (**3.1**, **3.2** et **3.3**) n'ont démontré aucune affinité avec la sélectine E (Figure 16). Pour la sélectine P,

seulement l'hydroxyle en C3 (**3.2**) s'est avéré crucial à l'activité.²¹ Une perte d'activité est logiquement et effectivement observée pour des analogues ne possédant pas le résidu fucose (**3.4**).⁸⁸ Afin d'étudier le rôle du méthyle du fucose, l'analogue **3.5** remplaçant le fucose par l'arabinose (équivalent à remplacer le méthyl par un hydrogène) a été testé. Celui-ci possède une activité 5 fois moindre que le sLe^X.²⁰ Il en est conclu que le fucose non modifié est un motif essentiel pour l'interaction pan-sélectines.

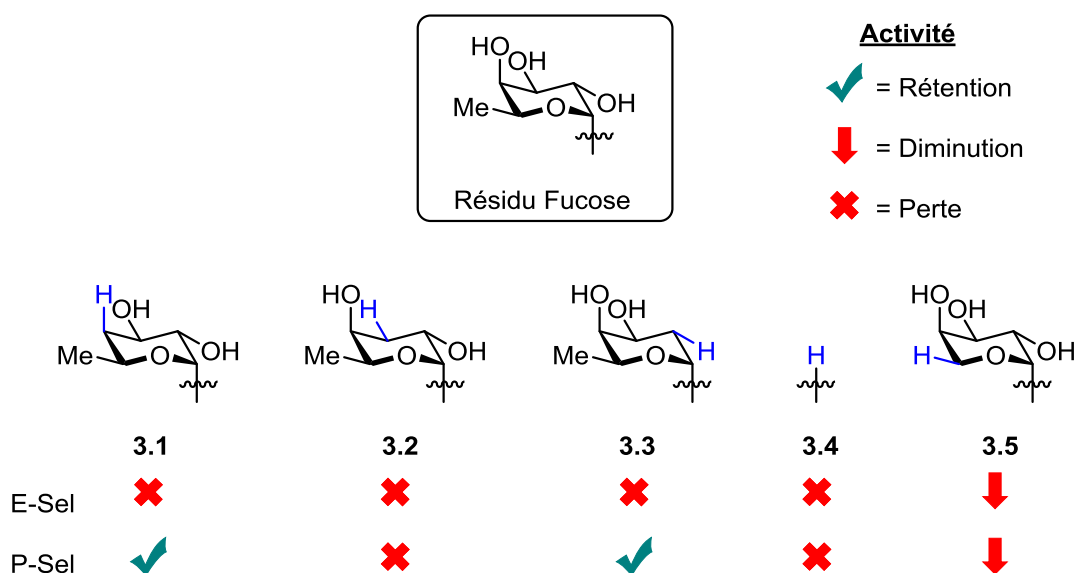


Figure 16. Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu fucose

3.2.2. Modification du résidu galactose

Pour ce qui est du résidu galactose (Figure 17), l'altération de l'hydroxyle en C6 par un fluor (**3.6**) ou un hydrogène (**3.7**) a eu pour effet de diminuer l'affinité envers la sélectine E par rapport au sLe^X.¹⁹ Des analogues ayant en C6 des groupements méthoxy, acétamides et amines (**3.8**) ont perdu toute activité pour la sélectine E.⁸⁹ L'incorporation d'un sulfate à cette position

(3.9) a un effet bénéfique pour l'affinité avec la sélectine P, mais provoque une perte d'activité complète pour la sélectine E.⁹⁰ Le remplacement de l'hydroxyle en C4 par un hydrogène (3.10) mène aussi à une perte d'activité.¹⁹ Ces effets furent expliqués par l'étude des rayons X qui montrent que le calcium se complexe avec le 4-OH et le 6-OH. Ainsi, ces deux hydroxyles sont les pharmacophores importants du galactose. De plus, l'obtention de la structure par rayons X a confirmé que le 2-OH n'est pas orienté vers le site de liaison.³³

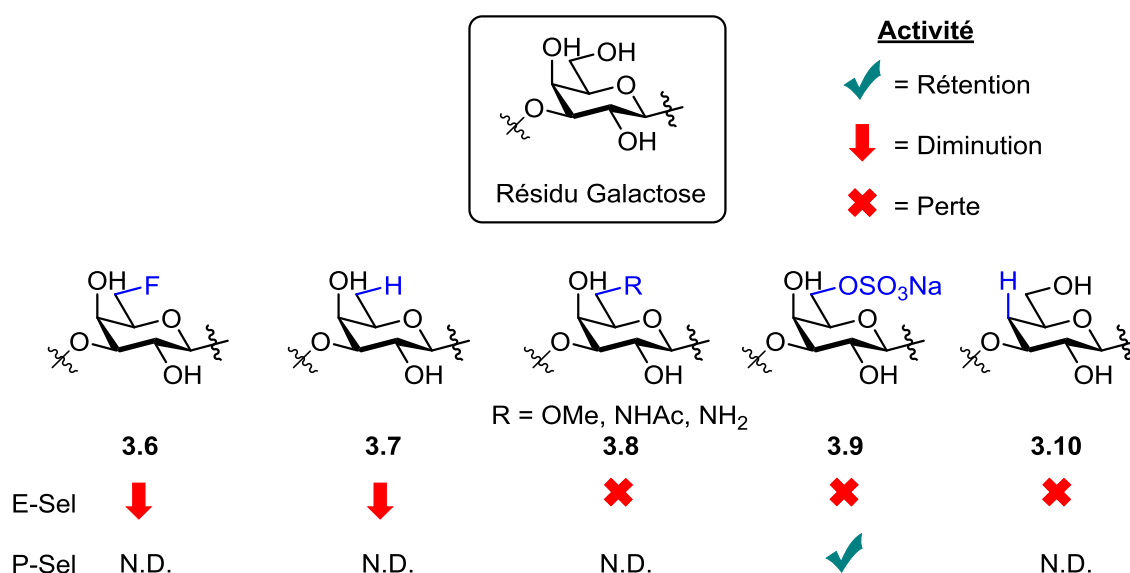


Figure 17. Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu galactose

3.2.3. Modification du résidu acide neuraminique

L'acide *N*-acétylneuraminique, aussi appelé acide sialique est composé d'un hydroxyle, un carboxylate, une chaîne glycérol et un amide. Hasewaga et ses collègues ont étudié le rôle de ces substituants dans l'interaction avec les sélectines (Figure 18). Plusieurs modifications de la chaîne glycérol (3.11) n'ont pas affecté l'activité envers la sélectine E.^{21,22} Il en est de même

si le groupement *N*-acétyle n'est pas présent (3.12).²¹ Le carboxylate semble être le seul groupement important pour l'interaction avec les sélectines. De plus, Il est possible de remplacer complètement l'acide sialique par des groupements chargés (sulfates, phosphates, etc.) en C3 du galactose (3.13) et de conserver l'activité.^{91,92}

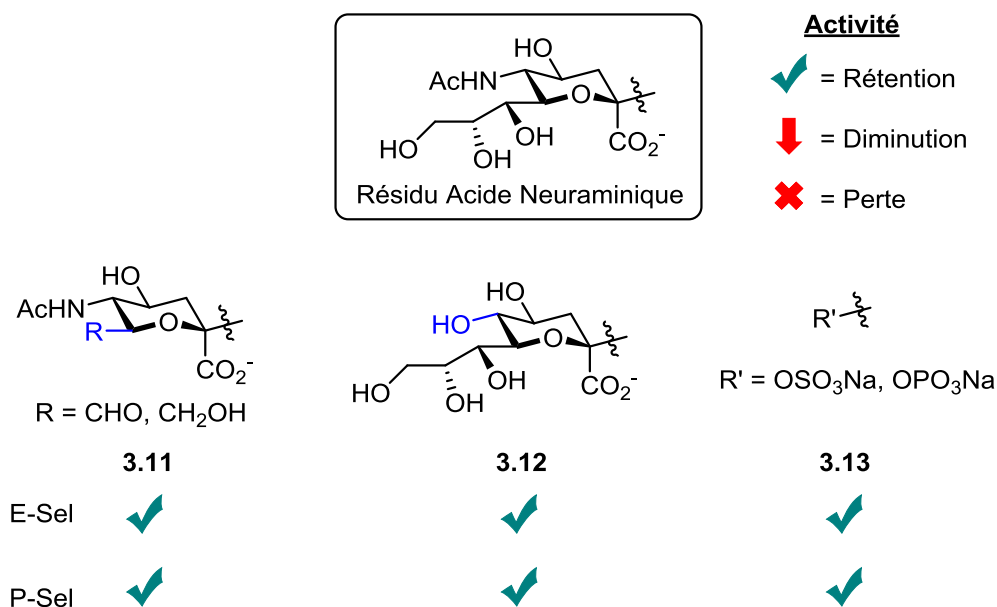


Figure 18. Rétention, diminution ou perte d'activité envers les sélectines E et P pour les analogues du résidu acide neuraminique

3.2.4. Modification du résidu glucosamine

Plusieurs études ont démontré que le résidu GlcNAc n'est pas impliqué directement dans l'interaction entre sLe^x et les sélectines⁹³. Par exemple, le fait de remplacer ce sucre par le glycal correspondant n'affecte pas l'affinité avec les sélectines.⁹⁴ Ce résidu aurait comme rôle d'orienter le galactose et le fucose dans une conformation gauche, soit leur conformation bioactive (Figure 19).⁹⁵

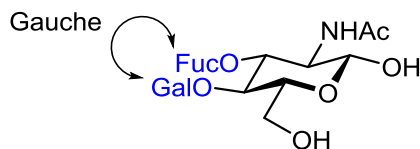


Figure 19. Résidu glucosamine servant d'orienteur pour les résidus fucose et galactose

3.3. Mimétiques du sialyl Lewis^X dans la littérature

À la lumière des études de structure-activité et des analyses tridimensionnelles, plusieurs mimétiques de sLe^X ont été synthétisés et testés par différents groupes de recherche. Une stratégie pour la conception de nouveaux analogues s'est démarquée parmi d'autres. Il s'agit de remplacer les résidus qui ne participent pas ou peu à l'interaction avec les sélectines. La partie acide sialique, n'étant pas impliquée dans la liaison à l'exception du carboxylate, peut être remplacée par un groupement chargé. Le résidu a souvent été remplacé par une chaîne acide oxyacétique (**3.14**). Pour les analogues de Ernst^{96,97}, l'utilisation d'une chaîne (S)-cyclohexyl acide lactique (**3.15**) et (S)-phényl acide lactique (**3.16**) ont montré de meilleures activités que l'utilisation de l'acide oxyacétique ou les chaînes (R)-cyclohexyl acide lactique (**3.17**) et (R)-phényl acide lactique (**3.18**) (Figure 20). Ainsi, la présence d'un substituant (S) encombrant semble avantager une orientation favorable du carboxylate.

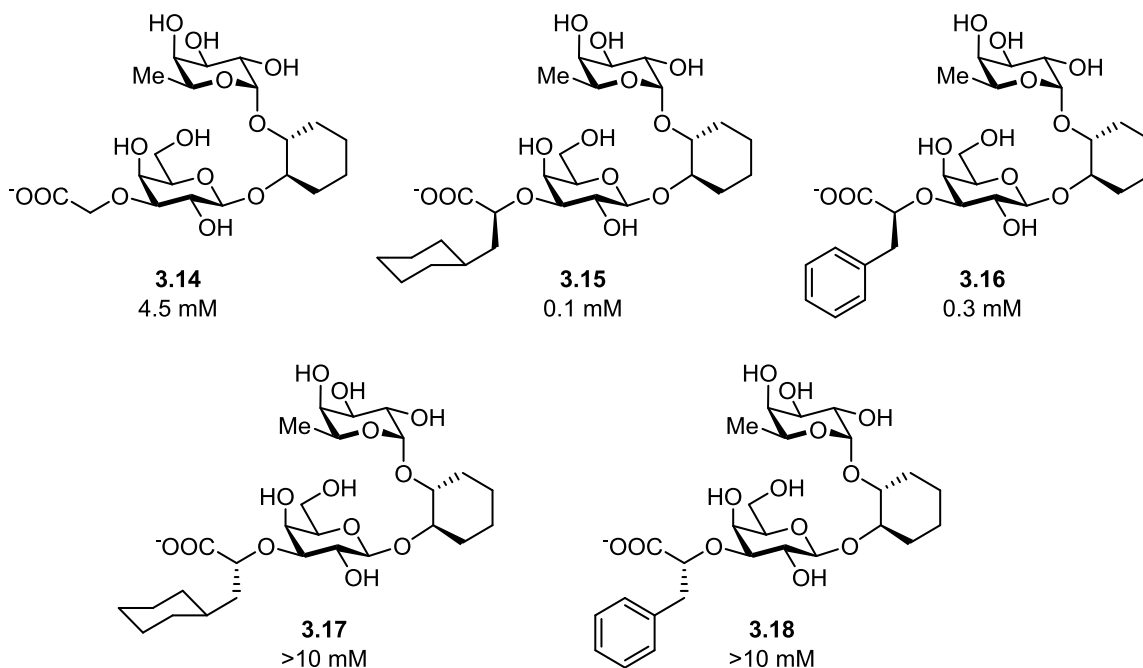


Figure 20. Activité envers la sélectine E pour différents groupes remplaçant NeuAc.

Aussi, puisque le GlcNAc ne sert que d'orienteur, il peut être remplacé par d'autres motifs similaires. Plusieurs espaceurs ont été incorporés et font généralement partie de deux catégories, soit les espaceurs cycliques et les espaceurs acycliques. (Figure 21) Lorsque GlcNAc est remplacé par un cyclohexane (**3.14**), ce dernier possède une activité semblable à sLe^X.⁹⁸ Les espaceurs cycliques de style cyclohexane ont l'avantage d'imiter la forme et la rigidité d'un pyranose et ainsi de conserver l'orientation gauche du fucose et du galactose requise pour être reconnu par les sélectines.⁹⁹ Toutefois, cette orientation est rigide et il n'est alors pas possible d'examiner s'il y aurait un effet positif sur l'activité en changeant légèrement l'angle entre les deux résidus. De plus, le cyclohexane est difficilement fonctionnalisable, ce qui restreint la diversité des analogues. L'analogue **3.19** comportant un benzène comme espaceur cyclique n'est pas actif, puisqu'il bloque le fucose et le galactose dans une orientation néfaste pour l'interaction avec le site de liaison.⁹⁸ D'un autre côté, les espaceurs acycliques permettent plus de liberté

conformationnelle, mais celle-ci est souvent trop grande et néfaste au niveau de l'entropie de liaison. Pour cette raison, les espaceurs acycliques comme **3.20** offrent des activités médiocres.¹⁰⁰ Ces exemples démontrent l'importance de la préorganisation de la molécule dans sa conformation bioactive.

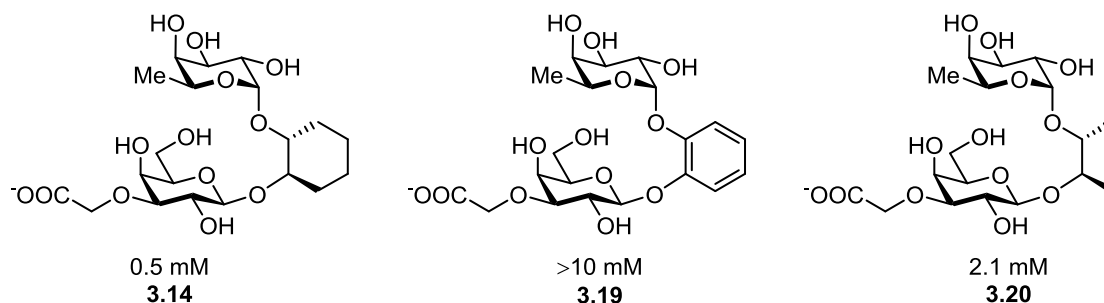


Figure 21. Différents espaceurs cycliques et acycliques remplaçant GlcNAc

Plus récemment, Ernst a rapporté de nouveaux mimétiques du sLe^x présentant un second site de liaison sur la sélectine E. La méthode appelée *fragment-based drug discovery* (FBDD) guidée par des études RMN a été utilisée afin de cribler différents ligands. Le ligand 5-nitroindole, relié à un mimétique du sLe^x par une chaîne dérivée d'un triazole a été identifié comme meilleur candidat de cette étude (Figure 22).

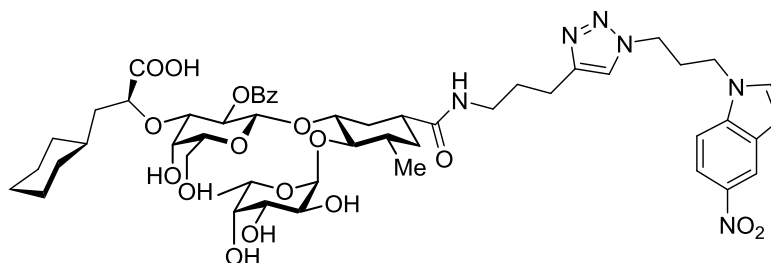


Figure 22. Analogue de Ernst obtenu par *fragment-based drug discovery*

Bien évidemment, ceci n'est qu'une infime partie des efforts mis dans la synthèse de mimétiques du sLe^x par la communauté scientifique.⁹⁵ Les exemples cités précédemment sont

des résultats intéressants et piliers des travaux de notre laboratoire visant à utiliser une nouvelle catégorie d'espaceur et à obtenir une meilleure affinité pour la sélectine P que GMI-1070 (Figure 12), ce qui pourrait conduire à l'élaboration d'agents thérapeutiques complémentaires.

3.4. Mimétiques du sialyl Lewis^X rapportés par notre laboratoire

3.4.1. Utilisation du tartrate comme espaceur

L'objectif derrière la synthèse de nos mimétiques est d'utiliser un nouvel espaceur qui offre une orientation modulable des pharmacophores tout en gardant l'alignement gauche des résidus galactose et fucose. Un tel espaceur fut découvert suite à des travaux sur l'ouverture d'acétals de tartrates.¹⁰¹ Il a été observé que cette ouverture se faisait de façon sélective en utilisant un acide de Lewis de bore tel que Me_2BBr et qu'il est possible d'obtenir des alcools secondaires de façon hautement diastéréosélective en utilisant le cuprate $\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2$ (Figure 23A). Ainsi, l'étude plus détaillée du mécanisme de cette réaction a mené à l'obtention de la structure par diffraction des rayons X du dérivé bromoéther **3.21**. Il a alors été observé que les oxygènes du tartrate sont gauches et que les esters sont antipériplanaires (Figure 23B)¹⁰². Ce biais conformationnel pourrait être expliqué par la minimisation énergétique en enlignant les dipôles de façon anti, ainsi que par l'effet gauche lorsqu'il y a deux atomes d'oxygène vicinaux (Figure 23C).

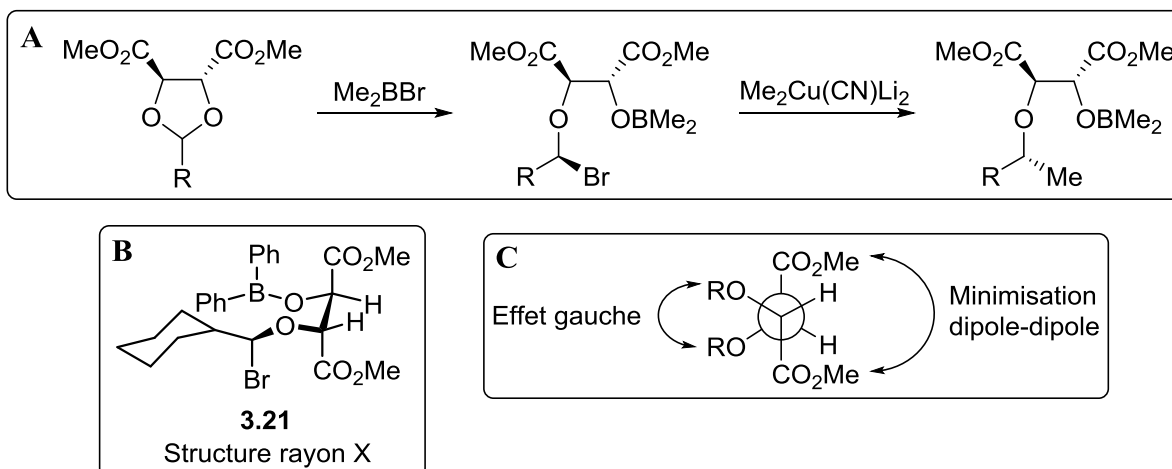


Figure 23. (A) Travaux ayant mené à l'utilisation du tartrate comme espaceur (B) Conformation d'un dérivé du L-tartrate confirmé par rayons X (C) Effets stabilisants en projection de Newman

Ces résultats nous ont conduits à considérer le L-tartrate comme espaceur pour remplacer GlcNAc (Figure 24) afin de potentiellement induire l'orientation gauche entre le galactose et le fucose. L'hypothèse était que l'orientation de ces deux unités pourrait être modulable en faisant varier la nature des groupements esters du tartrate (R^1 et R^2).

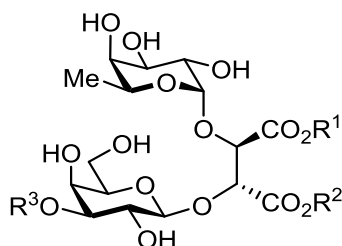


Figure 24. Structure générale des mimétiques basés sur le L-tartrate

3.4.2. Effet des groupements sur le résidu galactose

C'est en 2001 que Thoma rapporte pour la première fois des analogues comportant un benzoate en C2 du galactose (Figure 25).¹⁰³ Le benzoate était à l'origine un groupement protecteur qui devait être retiré en fin de synthèse, mais s'est avéré trop résistant aux conditions de déprotection. De façon surprenante, ces analogues ont une activité accrue par rapport aux mêmes analogues sans le benzoate. Comme il a été vu précédemment, l'hydroxyle de cette position n'a pas d'interaction directe avec les sélectines. Cette amélioration d'activité serait plutôt associée à l'encombrement stérique qui induit une conformation avantageuse plus rapprochée des résidus galactose et fucose.¹⁰³ Depuis cette découverte, l'incorporation d'un benzoate en C2 du galactose sur des mimétiques du sLe^x est devenue plus fréquente.

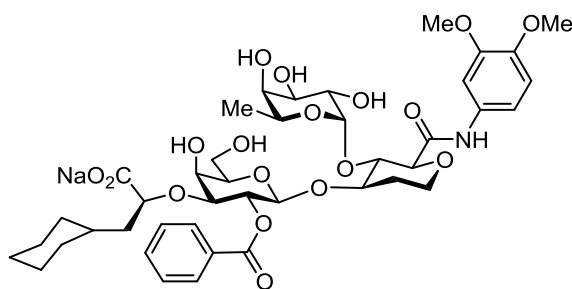
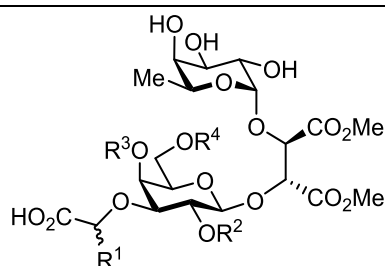


Figure 25. Analogue comportant un benzoate en C2 du galactose

La synthèse de la première génération de mimétiques utilisant le tartrate comme espaceur a été principalement réalisée par Mohammed Bencheqroun et Mickaël Calosso.^{63,104,105} Les résultats biologiques ont été obtenus à l'aide de tests d'adhésion cellulaire (statiques) et de tests de compétition direct par SPR (dynamiques) envers les sélectines E et P.^{63,104} L'effet sur l'activité pour différents groupements sur le galactose ont d'abord été examinés (Tableau 1, Entrées 1-5). L'analogue **3.22**, qui comporte une chaîne acide oxyacétique en C3 et trois

hydroxyles libres, n'a montré aucune activité (Entrée 1). Par la suite, en ajoutant un benzoate en C2 (**3.23**, Entrée 2), l'activité est augmentée comme pour les analogues de Thoma. L'activité est encore améliorée pour le composé **3.24** ayant des benzoates en C2 et en C4 (Entrée 3). Ceci est étonnant, puisque l'hydroxyle en C4 est directement impliqué dans l'interaction avec les sélectines en formant un pont hydrogène avec une tyrosine. Le remplacement de l'hydroxyle par un benzoate empêche le pont hydrogène, mais permettrait un empilement aromatique favorable entre le benzoate et Tyr94. Toutefois, l'activité est perdue si on utilise un groupement aromatique trop encombrant en C4, comme pour le cas du naphtalène (**3.26**, Entrée 5). Finalement, rajouter un benzoate en C6 (**3.25**, Entrée 4) a pour effet de diminuer l'affinité aux sélectines.

Tableau 1. Résultats biologiques associés à différents groupements sur le galactose

Entrée	Substrat					Essais statiques		Essais dynamiques
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Sélectine E	Sélectine P	Sélectine P
Entrée	Substrat	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ ^a (Rel ^b)	IC ₅₀ ^a (Rel ^b)	IC ₅₀ ^a (Rel ^b)
1	3.22	H	H	H	H	N.D.	N.D.	>1.0
2	3.23	H	Bz	H	H	3.04 (1.20)	2.08 (1.80)	0.352 (1.80)
3	3.24	H	Bz	Bz	H	0.25 (13.8)	0.21 (15.8)	0.047 (14.4)
4	3.25	H	Bz	Bz	Bz	8.35 (0.42)	3.55 (0.99)	0.697 (0.94)
5	3.26	(R)Bn	Bz	napht	H	N.D.	N.D.	>1.0
6	3.27	(R)Bn	H	H	H	5.46 (0.66)	4.84 (0.71)	0.880 (0.75)
7	3.28	(S)Bn	Bz	H	H	9.62 (0.30)	8.36 (0.36)	0.971 (0.71)
8	3.29	(R)Bn	Bz	H	H	2.01 (1.80)	1.93 (1.78)	0.526 (1.25)
9	3.30	(R)Bn	Bz	Bz	H	0.14 (23.8)	0.11 (29.8)	0.018 (36.0)
10	3.31	(R)Bn	Bz	Bz	Bz	0.12 (29.4)	0.085 (37.1)	0.013 (52.6)

^a Unités : mM

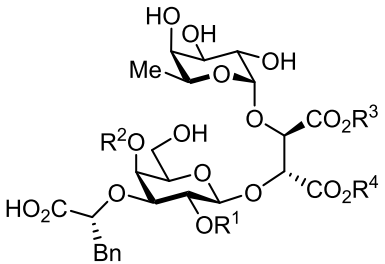
^b Rel = IC₅₀ relatif à sLe^x = IC₅₀(sLe^x) / IC₅₀(substrat)

Différentes modifications de la chaîne oxyacétique ont par la suite été étudiées (Tableau 1, Entrées 6-10). L'incorporation d'une chaîne (R)-phényl acide lactique (**3.27**) à la place de la chaîne acide oxyacétique (**3.22**) a pour effet d'augmenter l'activité (Entrée 6). Pour nos analogues, une chaîne (R)-phényl acide lactique (**3.27**) semble favorable par rapport à une chaîne (S)-phényl acide lactique (**3.28**) (Entrées 6-7) contrairement à ce qui avait pu être observé pour les analogues de Ernst (Figure 20). L'ajout des benzoates sur le galactose suit la même tendance qu'avec la chaîne oxyacétique (Entrées 8-9), à l'exception du tribenzoate **3.31** qui montre une meilleure activité que le dibenzoate. (Entrée 10) Cependant, à cause de sa faible solubilité, le tribenzoate n'a pas été considéré comme candidat potentiel.

3.4.3. Effet de la nature des esters sur le tartrate

Une fois la partie galactose optimisée, les travaux se sont tournés vers l'étude de la nature des groupements esters du tartrate sur l'activité des analogues (Tableau 2). En remplaçant les esters méthyliques (**3.32**, Entrée 1) par des esters isopropyliques (Entrée 2), l'activité est nettement augmentée, jusqu'à obtenir le meilleur candidat **3.33** qui est 79 fois plus actif que sLe^X. Ce phénomène a été attribué à l'augmentation de l'encombrement stérique des esters, ce qui aurait pour effet d'orienter favorablement les résidus galactose et fucose vers la conformation biologiquement active. Afin de moduler cette orientation, des analogues d'esters différenciés **3.36** et **3.37** ont été testés (Entrées 5-6), mais leur activité ne fut pas supérieure. De plus, il a été démontré avec les molécules **3.34** et **3.35** que les benzoates en C2 et en C4 sont aussi nécessaires pour les analogues isopropyliques (Entrées 3-4), mais que le benzoate en C4 est plus important pour une meilleure activité.

Tableau 2. Résultats biologiques associés à différents groupements sur le résidu galactose et différents esters du tartrate

Entrée	Substrat					Essais statiques		Essais dynamiques
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Sélectine E	Sélectine P	Sélectine P
1	3.32	Bz	Bz	Me	Me	0.14 (23.8)	0.11 (29.8)	0.018 (36.0)
2	3.33	Bz	Bz	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	0.076 (46.8)	0.067 (52.5)	0.008 (79.3)
3	3.34	Bz	H	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	0.22 (16.1)	0.19 (17.6)	0.034 (9.0)
4	3.35	H	Bz	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	N.D.	N.D.	0.019 (28.0)
5	3.36	Bz	Bz	Me	<i>i</i> -Pr	N.D.	N.D.	0.021 (31.6)
6	3.37	Bz	Bz	<i>i</i> -Pr	Me	N.D.	N.D.	0.016 (40.5)
7	3.38	Voir figure 26				N.D.	N.D.	0.008 (82.0)

^a Unités : mM

^b Rel = IC₅₀ relatif à sLe^X = IC₅₀(sLe^X) / IC₅₀(substrat)

L'analogue dimérique (**3.38**, Entrée 7) illustré à la figure 26 a aussi été synthétisé et testé. L'avantage du dimère est son potentiel à être bivalent. En effet, on pourrait imaginer que lorsqu'un côté se délie d'une sélectine, l'autre côté commence à interagir avec une autre sélectine à proximité et ainsi être lié aux sélectines sur une plus longue période de temps. Cet analogue a obtenu une activité comparable au meilleur candidat **3.33**, mais il a finalement été écarté en raison de la complexité de sa synthèse.

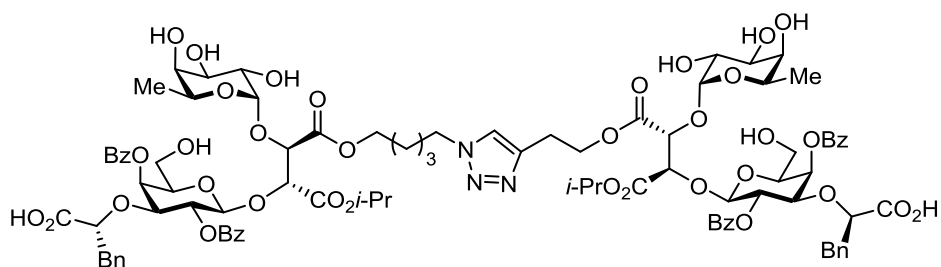
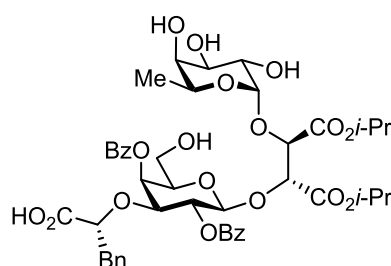


Figure 26. Analogue dimérique **3.38** du sLe^X

Le développement d'une première génération de mimétiques du sLe^x présenté dans ce chapitre a permis à notre laboratoire d'obtenir l'analogue **3.33** (LCB-111) qui est 79 fois plus actif que le sLe^x envers la sélectine P (Figure 27). Avec un IC₅₀ de 8 µM pour la sélectine P, l'activité de LCB-111 est supérieure à celle de GMI-1070 (423 µM). Les tests de l'activité pour la sélectine E en conditions dynamiques n'ont pas été effectuées, mais les essais statiques démontrent une activité moindre par rapport à GMI-1070, mais reste dans une gamme d'affinité similaire. En nous basant sur cet analogue prometteur et par désir d'obtenir de meilleures affinités, nous avons élaboré une seconde génération de mimétiques du sLe^x dont la synthèse et les résultats biologiques seront discutés respectivement au chapitre 4 et 5.



LCB-111
(3.33)
Essais dynamiques:
IC₅₀ (P-Sel) = 8 µM
Essais statiques:
IC₅₀ (E-Sel) = 76 µM
IC₅₀ (P-Sel) = 67 µM

40

4. Synthèse d'une nouvelle génération de mimétiques du sialyl Lewis^X

L'objectif de mon projet de maîtrise est de synthétiser une seconde génération d'analogues qui profiteraient d'un second site de liaison sur les sélectines P et ainsi d'augmenter davantage l'activité de nos mimétiques. Il a été démontré que PSGL-1 se lie à la sélectine P non seulement grâce à l'interaction du motif sLe^X, mais aussi grâce à un groupe de trois tyrosines sulfatées (Tyr-SO₃) à son extrémité N-terminale.¹⁰⁶ Ces groupements chargés négativement se lient à une portion de la sélectine P qui possède un potentiel électrostatique positif.³³

4.1. Conception de la nouvelle génération

Afin de pouvoir bénéficier du site de liaison des Tyr-SO₃, il faut incorporer à nos analogues une chaîne latérale qui comporte un pharmacophore anionique. Cette chaîne doit être assez longue pour que le pharmacophore puisse atteindre le site de liaison des Tyr-SO₃. Ainsi, cette partie de la molécule ne sert que d'espaceur entre le motif analogue au sLe^X et le motif analogue aux Tyr-SO₃. La structure générale choisie pour cette nouvelle génération est illustrée au schéma 6. Le méthyle incorporé sur l'espaceur sert à imiter un isopropyle, puisque nous avons vu précédemment que les esters isopropyles possédaient de meilleures activités. Ces analogues seront obtenus suite à un couplage entre le précurseur **4.48** et des nucléophiles comportant des sulfonates ou phosphates. **4.48** sera obtenu à partir de l'azide **4.40** à l'aide d'une glycosylation avec le résidu galactose **4.21** suivi d'une cycloaddition de Huisgen. L'obtention

du tartrate différencié se fait grâce à la dioxolanone **4.27** qui sera elle-même obtenue en quelques étapes à partir du L-fucose. Le résidu galactose **4.21**, pour sa part, résulte d'une alkylation sélective en C3 du précurseur **4.3** qui est facilement synthétisé à partir du galactose pentaacétate.

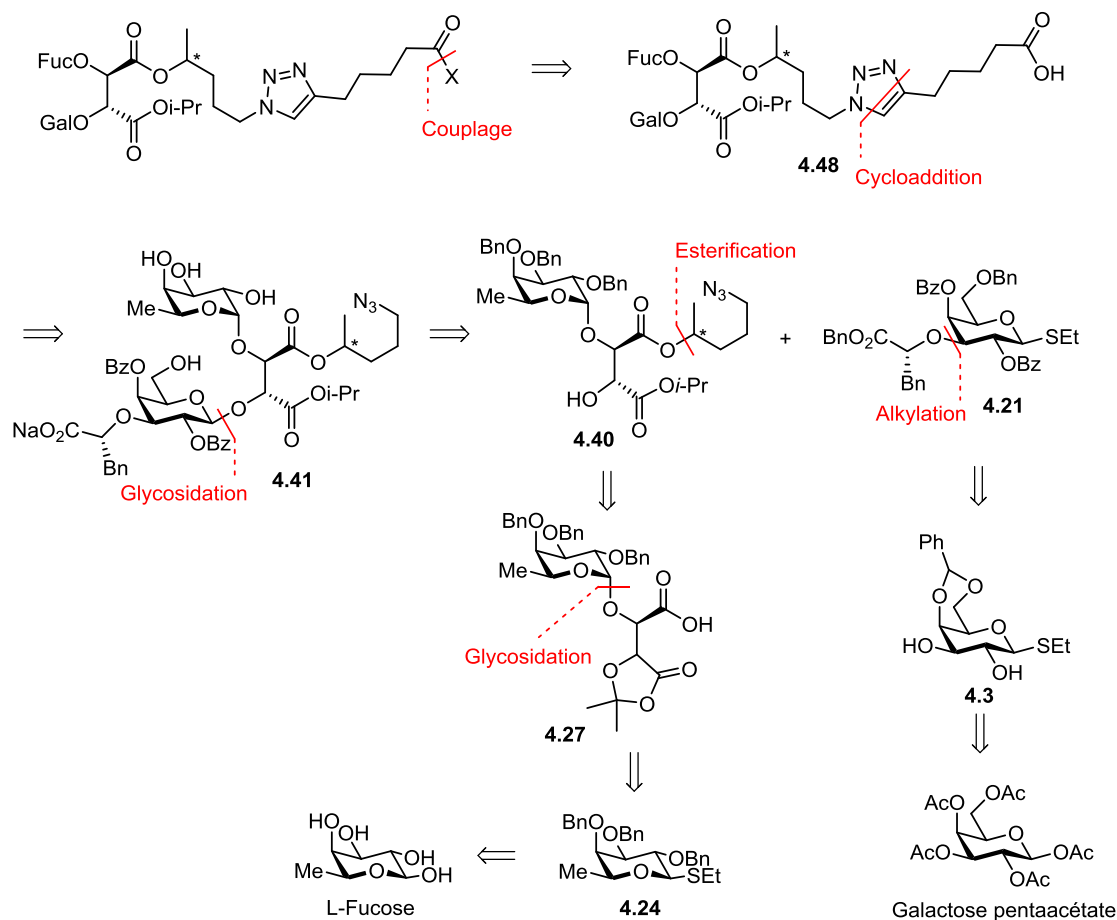


Schéma 6. Rétrosynthèse de la synthèse des nouveaux mimétiques de sLe^X

4.2. Synthèse du résidu galactose

Le plus gros défi dans la synthèse du résidu galactose **4.21** est l'incorporation de la chaîne L-phényl acide lactique en position C3. En effet, il est difficile d'être sélectif à une position par rapport à une autre sur un sucre, surtout entre deux hydroxyles secondaires. Puisque

les nouveaux analogues n'ont pas de modification au niveau du galactose, il est possible d'emprunter la voie de synthèse qui avait été utilisée pour la première génération. Cette voie a été problématique et il a été impératif d'essayer de l'optimiser ou de trouver une voie alternative.

4.2.1. Voie de synthèse existante

La rétrosynthèse du résidu **4.21** est présentée au schéma 7. Les transformations clefs sont l'alkylation sélective en C3 sur **4.3**, suivi de l'ouverture sélective du benzyldène sur le C6 de **4.4**. **4.3** est, quant à lui, obtenu suite à quelques transformations du galactose pentaacétate.

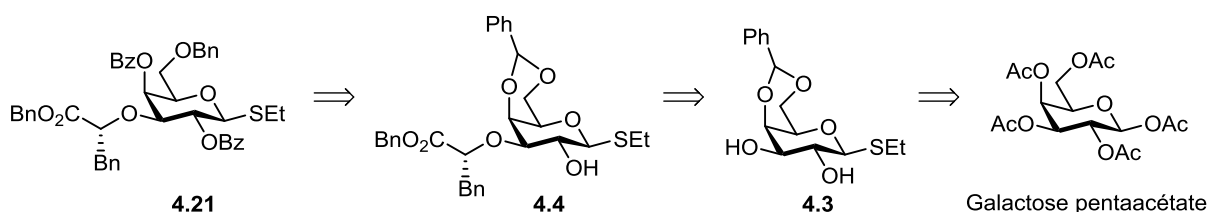


Schéma 7. Rétrosynthèse du résidu galactose

4.2.1.1. Thioglycosylation du galactose pentaacetate et formation du benzyldène

La première étape de la synthèse du résidu galactose est la thioglycosylation du D-galactose pentaacetate (Schéma 8). Cette transformation est importante, puisque le groupement thioéther qui est installé en position anomérique servira plus tard à la glycosidation du résidu galactose avec le résidu fucose-tartrate de la molécule cible. L'utilisation du promoteur acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ permet l'activation de la position anomérique alors que l'acétate en C2 permet la formation de l'anion dioxolénium (voir section 2.4.2) qui conduit à l'addition de l'éthanethiol majoritairement en position β . Un ratio de 8 : 1 a été obtenu en faveur de l'anomère β . La stéréochimie du centre anomérique n'est pas importante pour le moment, puisque la chiralité

sera détruite plus tard dans la synthèse lors de la glycosylation avec le tartrate. Ainsi, la voie de synthèse est complétée sans séparer les deux anomères. Puisque cette réaction génère très peu de produits secondaires, le mélange réactionnel nécessite une seule extraction pour être utilisé dans la seconde réaction. Cette réaction a aussi été effectuée avec succès en utilisant TMSOTf comme promoteur, mais elle nécessite 5 équivalents d'éthanethiol et un temps de réaction plus long.

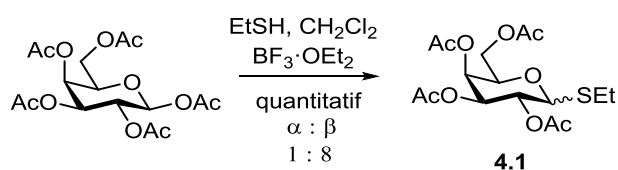


Schéma 8. Thioglycosylation du galactose pentaacétate

La synthèse se poursuit avec la déprotection des quatre acétates restants. En présence de méthanolate de sodium, la déprotection de **4.1** pour former le tétraol **4.2** se fait de façon quantitative. Ce dernier, lorsque traité avec du benzylidène diméthyle acétal en présence d'une quantité catalytique de CSA ou de PTSA, mène à la formation du 4,6-O-benzylidène **4.3** (Schéma 9).

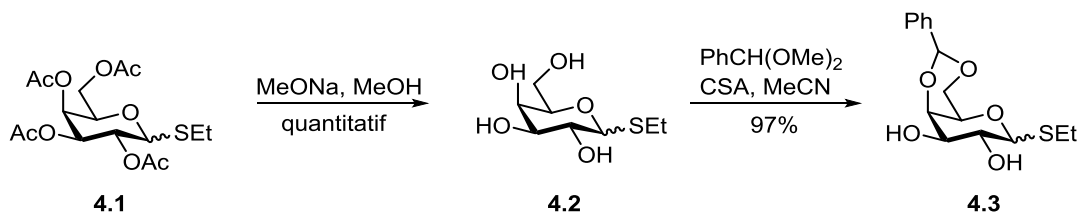


Schéma 9. Synthèse de l'intermédiaire **4.3**

4.2.1.2. Alkylation régiosélective en C3

La plus grande difficulté en ce qui concerne la chimie des hydrates de carbone est d'obtenir de la régiosélectivité parmi les différentes fonctions alcool de la molécule. Au cours des années, cette problématique est au cœur de plusieurs études et bien que plusieurs méthodes aient été développées, elle reste une limitation bien présente dans la synthèse des sucres. Parmi les méthodes développées afin d'obtenir de la sélectivité entre hydroxyles, on retrouve la méthode des acétals d'étain.¹⁰⁷ L'utilité des acétals d'étain a été découverte en 1974 par Moffatt¹⁰⁸, puis étudié et adapté par Hanessian¹⁰⁹. Ces espèces (**4B**) sont formées en faisant réagir un diol (**4A**) avec l'oxyde de dibutyle étain et permettent la formation régiosélective d'espèces monosubstituées (**4C**) lors d'alkylation ou d'acylation (Schéma 10).

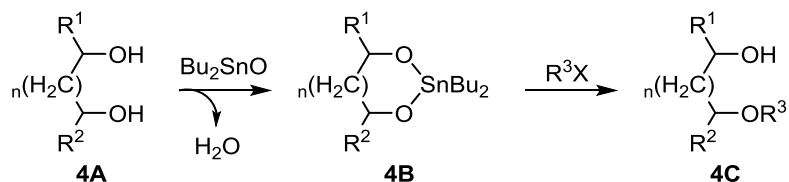


Schéma 10. Le traitement d'un acétal d'étain avec un électrophile résulte en une monosubstitution sélective

Les acétals d'étain sont utilisés surtout lors d'alkylation ou acylation d'un hydroxyle en présence d'un ou de plusieurs autres hydroxyles libres. Il a été observé que la plupart des acétals d'étain de dérivés carbohydrates adoptent préférentiellement la forme de dimères (**4D**) en solution.^{110,111}

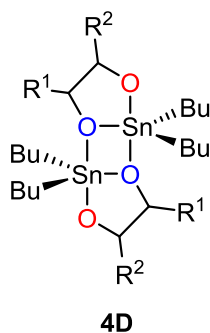


Figure 28. Structure dimérique d'un acétal d'étain

Une hypothèse concernant la régiosélectivité de ces réactions se base sur cette structure dimérique. Dans le dimère d'un acétal d'étain, les deux alcools du diol sont différenciés. En effet, les oxygènes bleus sont en position équatoriale et les rouges en position apicale de la bipyramide trigonale centrée sur l'atome d'étain (Figure 27). Il est connu que le ligand le plus électronégatif adopte généralement la position apicale dans une bipyramide trigonale. Ainsi, l'oxygène en position apicale devrait être celui qui est le plus réactif dans la substitution sélective.¹¹² De plus, l'oxygène en position équatoriale ne peut pas réagir en raison de sa tricoordination. L'encombrement stérique a aussi un impact sur le dimère qui sera favorisé. Toutefois, il est difficile de prédire lequel sera favorisé, et donc de savoir quel oxygène occupera la position apicale lorsqu'il s'agit d'hydrates de carbone.

L'addition d'autres nucléophiles dans la réaction de substitution augmente largement la vitesse de la réaction, car ils pourraient jouer un rôle dans la structure des intermédiaires ou même changer le mécanisme de la réaction.¹¹³ Parmi les nucléophiles les plus utilisés, on retrouve le fluorure de césium^{114,115}, les halogénures de tétrabutylammonium¹¹⁶ et la *N*-méthylimidazole¹¹⁷. Il a été proposé que ces nucléophiles permettent la formation d'un

complexe monomère où l'atome d'étain est pentacoordiné (**4E**).¹¹⁸ Dans le cas d'un diol possédant un alcool primaire et un secondaire (Schéma 11), la formation de l'alcoolate **4F** se fait plus rapidement que l'alcoolate **4I**, puisque l'étain est stériquement moins encombré sur l'alcool primaire. Toutefois, **4G** est défavorisé pour l'alkylation par son encombrement. L'autre alcoolate (**4J**) est alkylé plus rapidement, alors l'équilibre se déplace vers la formation de **4K**.

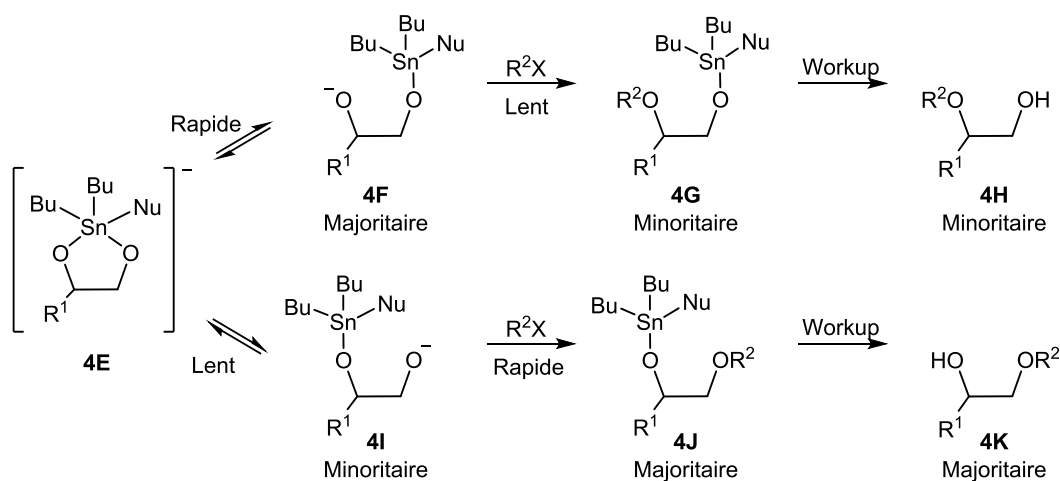


Schéma 11. Mécanisme proposé pour expliquer la régiosélectivité de la substitution sur un acétal d'étain lorsqu'il y a un nucléophile ajouté

Cette stratégie a été appliquée à la synthèse du résidu galactose en utilisant l'intermédiaire **4.3** pour la formation de l'acétal d'étain. Il a été observé précédemment que cet acétal d'étain offre une sélectivité pour la O-alkylation en C3.^{63,104} Cette méthode est la plus utilisée pour la synthèse de mimétiques du sLe^x comportant une chaîne acide lactique en C3.¹¹⁹⁻¹²¹ Les acétals d'étain sont préparés en faisant réagir un diol avec l'oxyde de dibutyle étain dans le benzène ou le toluène en effectuant une élimination azéotrope de l'eau. Dans certains cas, il est possible d'obtenir l'acétal en utilisant le méthanol comme solvant sans élimination azéotropique de l'eau¹²² et c'est cette méthode qui a été utilisée pour synthétiser l'acétal **4.4**.

transformation de **4.6** à **4.7** (Schéma 13) avec une sélectivité pour la protection en C3. Puisque notre molécule **4.3** est très semblable à **4.6**, cette réaction a été tentée pour obtenir **4.8**. Il serait alors possible d'installer un benzoate en C2, puis, suite à la déprotection du chloroacétate, alkyler en C3. Malheureusement, l'acylation n'a pas montré une sélectivité significative pour C3 face à C2 pour notre substrat **4.3**, oscillant entre des rendements de 19% à 47% pour la formation de **4.8** (Schéma 13). Il est possible que le substituant phényle sur le thioacétal de **4.6** produise de l'encombrement au niveau de l'hydroxyle en C2, permettant une meilleure sélectivité. Cette piste a donc été écartée.

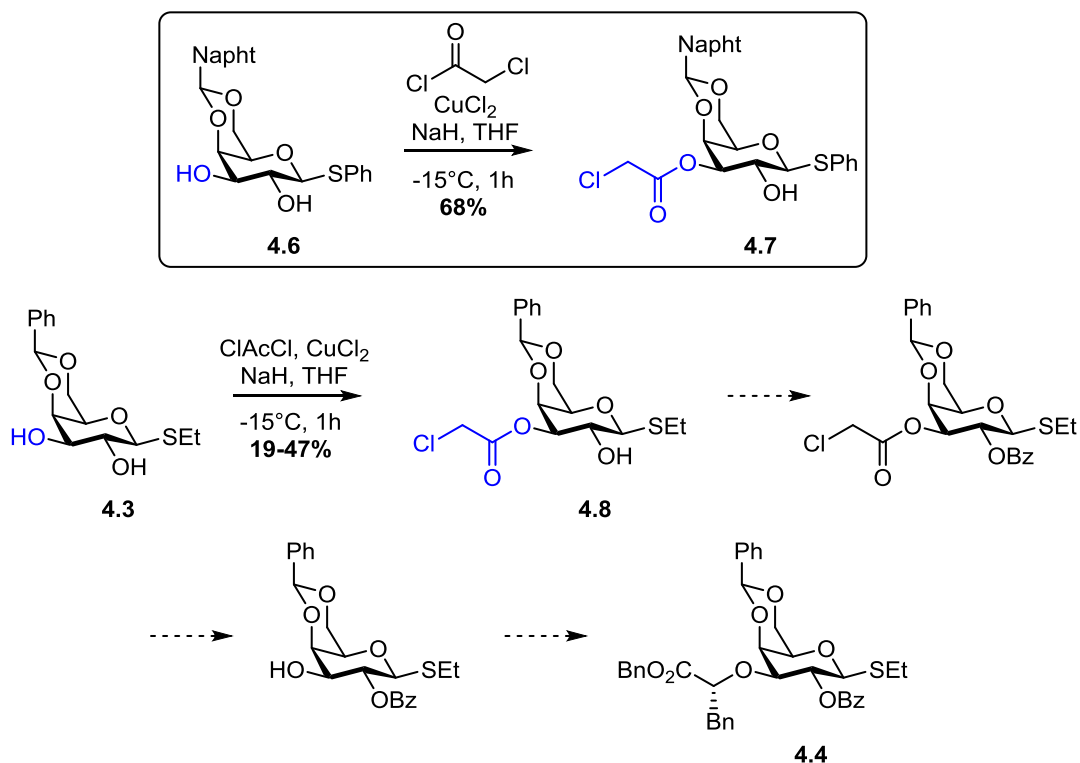


Schéma 13. Protection sélective en C3 dans la littérature et possibilité de synthèse de **4.4**.

4.2.2.2. Benzoylation sélective en C2

Un article publié par Ye et son groupe¹²⁴ rapporte une benzoylation sélective en C2 sur le galactopyrannoside **4.9** (Schéma 14). Le composé **4.9** a été préparé afin de pouvoir tester cette réaction avec le même produit de départ. Malheureusement, il aura été impossible de reproduire leur sélectivité puisque nous observons au contraire une majorité de benzoylation en C3.

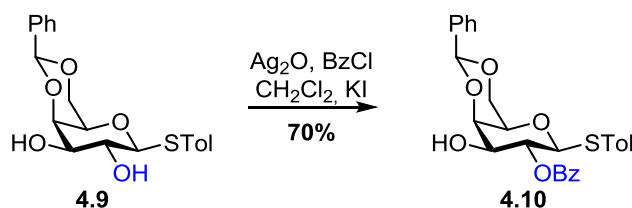


Schéma 14. Benzoylation sélective en C2 dans la littérature

4.2.2.3. Ouverture sélective d'un 2,3-orthobenzoate

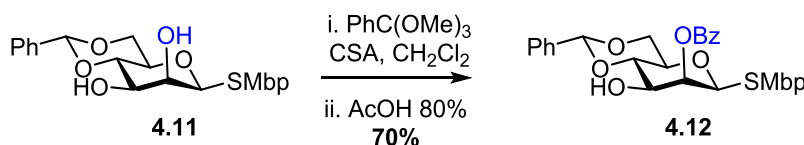


Schéma 15. Conditions rapportées pour l'ouverture sélective d'un 2,3-orthobenzoate

Une façon alternative d'obtenir un benzoate en C2 serait d'ouvrir sélectivement un 2,3-orthobenzoate comme il a été rapporté pour la synthèse de **4.12** (Schéma 15).¹²⁵ Lorsque notre substrat est soumis à ces conditions ou même en chauffant à 75°C , il n'y a aucune trace de la formation d'un 2,3-orthobenzoate **4.13** (Schéma 16). Il est probable que la formation d'un orthobenzoate sur des hydroxyles *trans* ne soit pas favorisée. En effet, il n'y a aucun exemple de formation de 2,3-orthobenzoates dans la littérature sur un diol 2,3-*trans*.

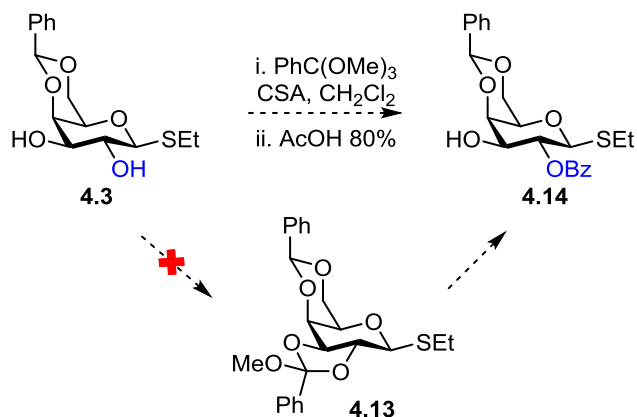


Schéma 16. Tentative non réussie de la formation d'un 2,3-orthobenzoate sur **4.3**

4.2.2.4. Stratégie de groupements protecteurs permettant l'installation d'un benzoate en C2

Li et Gildersleeve¹²⁶ ont décrit une séquence de quatre étapes à partir du tétraol **4.15** menant à la formation du monosaccharide entièrement protégé à l'exception de l'hydroxyle en C3 (Schéma 17). La première étape consiste à la protection simultanée des hydroxyles en position 3, 4 et 6. En effet, lorsque **4.15** est mis en présence d'un excès de 2,2-diméthoxypropane et d'une quantité catalytique de CSA, on observe la formation du 3,4-acétonide ainsi que du méthoxyisopropyle éther en C6. L'intermédiaire **4.16** permet ensuite la protection par un benzoate en C2, puisque c'est le seul hydroxyle libre. L'hydrolyse acide de **4.17** produit le triol **4.18**, qui est par la suite soumis aux conditions pour la formation du 4,6-benzylidène **4.19**.

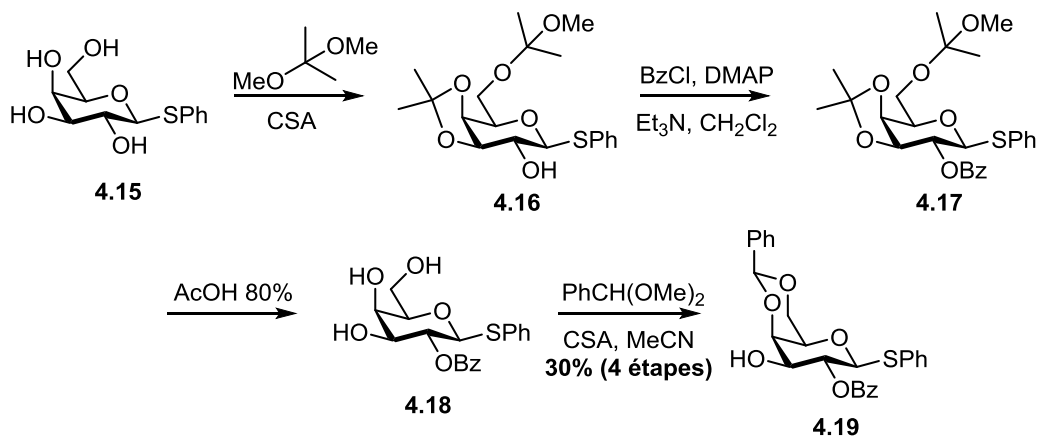


Schéma 17. Quatre étapes pour l'obtention de l'hydroxyle libre en C3

Ces étapes ont été effectuées avec notre intermédiaire **4.2** qui diffère seulement du thioacétal. Le composé **4.14** a été obtenu avec succès avec un rendement de 45% sur quatre étapes (Schéma 18). Ayant finalement obtenu **4.14**, l'étape suivante consistait à alkyler en C3 sans se soucier d'avoir des conditions régiosélectives, puisque tous les autres hydroxyles sont protégés. Plusieurs conditions d'alkylation ont été tentées (Tableau 3), mais aucune n'a permis la formation de **4.4**.

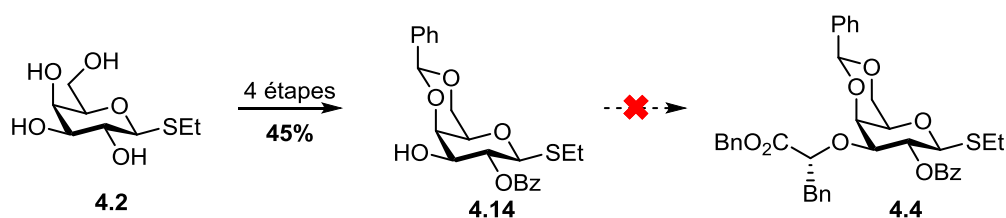
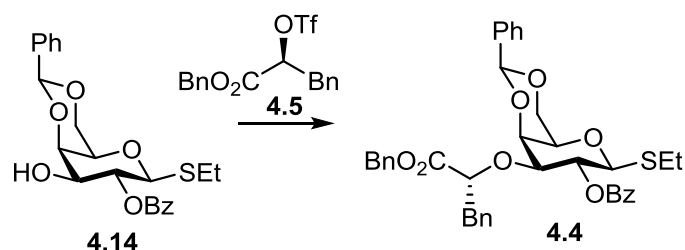


Schéma 18. Séquence visant l'obtention de **4.4** en passant par **4.14**

Lorsque **4.14** est en présence du triflate **4.5** et de base comme Et₃N, 2,6-lutidine ou DIPEA (Entrées 1-3), seulement le produit de départ est observé à température pièce. Chauffer la réaction ne semble pas améliorer la réactivité, sauf pour l'entrée 1, où la migration du benzoate de C2 à C3 est observée dans un ratio 1:1 avec le produit de départ après 16 heures à 40°C. L'utilisation de base plus forte comme LiHMDS et KHMDS (Entrées 4-5) mène à un mélange de produits non identifiable par RMN qui ne contient plus de produit de départ, mais aucune trace de produit désiré. L'hydruure de sodium (Entrée 6) est aussi non concluant puisqu'un mélange du produit de départ et du produit de migration de benzoate est récupéré après un temps de réaction de 16 heures. Afin d'augmenter la réactivité de l'alcoolate généré par la déprotonation de **4.14**, il est envisagé de remplacer le contre-ion sodium fortement lié par un contre ion tétrabutylammonium qui est faiblement lié. Pour ce faire, des conditions utilisant une quantité catalytique de TBAB¹²⁷ ont été tentées (Entrée 7). Le brut de cette réaction ne contenait pas de produit de départ, mais le produit désiré n'y était pas non plus. Pour la majorité de ces entrées, la décomposition du triflate ne serait pas la cause du manque de réactivité, puisque ce dernier est encore présent en grande quantité lorsqu'est analysé le brut réactionnel par RMN.

Tableau 3. Tentatives de l'alkylation en C3 pour obtenir **4.4**



Entrée	Réactifs	Solvant	T°	Temps	Résultat
1	Et ₃ N (2 éq.) 4.5 (2 éq.)	CH ₂ Cl ₂	0°C à tp	2 h	Produit de départ
			40°C	18 h	Début de migration Bz
2	2,6-Lutidine (2 éq.) 4.5 (2 éq.)	CH ₂ Cl ₂	tp	16 h	Produit de départ
3	DIPEA (2 éq.) 4.5 (2 éq.)	Toluène	85°C	16 h	Produit de départ
4	LiHMDS (2.6 éq.) 4.5 (5 éq.)	THF	-78°C	1 h	Produit de départ
			-20°C	1 h	Mélange compliqué
5	KHMDS (2.6 éq.) 4.5 (5 éq.)	DMF	-78 à -20°C	1 h	Mélange compliqué
6	NaH (1.15 éq.) 4.5 (2 éq.)	THF	0°C-tp	16 h	Produit de départ et migration Bz
7	NaH (1.5 éq.) 4.5 (2 éq.) TBAB (0.2 éq.)	DMF	tp	20h	Mélange compliqué

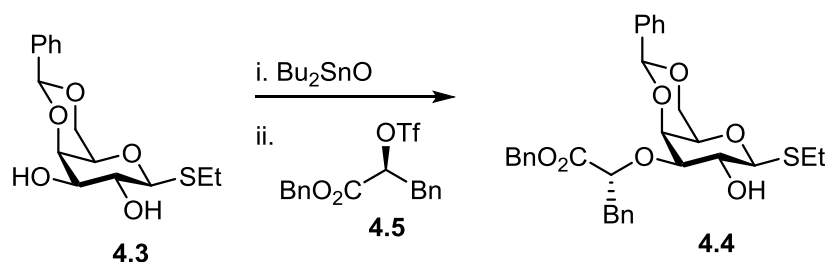
Après tous les efforts infructueux investis dans le développement d'une voie alternative à l'utilisation des acétals d'étain, il fut évident que ces derniers étaient pour l'instant la meilleure chance d'obtenir des analogues rapidement. Ainsi, nous nous sommes penchés sur l'optimisation de cette réaction.

4.2.3. Suite de la synthèse du résidu galactose

4.2.3.1. Retour vers les acétals d'étain

Afin d'optimiser l'alkylation sélective, plusieurs paramètres ont été étudiés. L'augmentation ou la diminution de la température entre 65°C et 85°C lors de l'étape de formation de l'acétal n'a montré aucune corrélation logique au niveau du rendement. Il en est de même pour le temps de réaction de la première et de la deuxième étape. En effet, le temps de la formation de l'acétal varié entre 2 à 3 heures ou de l'alkylation varié entre 1 à 16 heures n'ont pas donné des résultats cohérents. Il est nécessaire de bien se débarrasser de toute trace d'eau et du méthanol pour la seconde étape alors plusieurs techniques de dessiccation de l'acétal ont été essayées. Soit l'acétal est séché sous-vide pendant 3 heures, soit une ou plusieurs co-évaporation au toluène suivi de quelques minutes ou 3 heures sous-vide. Les résultats de ses différents essais de dessiccation n'ont pas été concluants. Ces multiples essais n'ont pas permis d'identifier un paramètre pouvant améliorer la reproductibilité de cette réaction alors d'autres conditions ont été investiguées (Tableau 4). Puisqu'il a été rapporté que la formation de l'acétal dans le méthanol génère parfois des rendements plus faibles¹⁰⁷, un autre solvant a été essayé, soit le toluène avec un montage de Dean Stark (Entrée 1). Un faible rendement de 30% a été obtenu pour cet essai. D'autres conditions connues^{128,129} ont été utilisées (Entrées 3-4) sans succès. Puisque les tests sont effectués à petite échelle, il a été pensé que le montage de Dean Stark n'était pas efficace alors un essai a été fait en remplaçant son usage par des tamis moléculaires (Entrée 5), mais le produit désiré n'est toujours pas formé.

Tableau 4. Tentatives d'optimisation de l'alkylation sélective utilisant un acétal d'étain



Entrée	Conditions	Rendement
2	i. Bu ₂ SnO, Toluène, 110°C, 4h ^a ii. CsF, 4.5 , THF, tp, 2.5h	30%
3	i. Bu ₂ SnO, Toluène/MeOH, 100°C, 3h ii. TBAB, 4.5 , DIPEA, Toluène, 100°C, 2-20h	Traces
4	i. Bu ₂ SnO, Toluène, 130°C, 3h ^a ii. TBAI, 4.5 , Toluène, 100°C, 3h	Mauvais produit
5	i. Bu ₂ SnO, Toluène, MS 4Å, 130°C, 3h ii. TBAI, 4.5 , Toluène, tp-70°C, 20h	Mauvais produit

^aEn utilisant un Dean Stark

Le fait que les résultats des conditions initiales soient peu reproductibles nous a permis de croire que la stabilité de l'acétal d'étain était la cause du manque de reproductibilité et de sélectivité. En effet, si l'acétal se décompose avant la réaction de substitution, il n'y a plus de sélectivité. De plus, il a été observé que deux essais dans les mêmes conditions, effectués en même temps, ont donné deux rendements totalement différents, et ce, avec pour seule différence l'utilisation d'un évaporateur rotatif différent lors de l'évaporation du méthanol. Un nouvel essai a été effectué en évaporant une petite quantité de triéthylamine juste avant l'évaporation du solvant afin d'éviter un d'avoir un environnement acide pouvant dégrader l'acétal. Depuis cet ajout au protocole, des rendements variants entre 53% et 79% ont été obtenus, ce qui est entièrement satisfaisant.

4.2.3.2. Ouverture sélective du benzylidène et dibenzoylation

Suite à l'alkylation sélective en C3, il reste à effectuer l'ouverture du benzylidène pour obtenir un benzyle en C6, ainsi que la protection des hydroxyles en C2 et C4 par des benzoates. La voie utilisée auparavant consistait à benzyler en C2, ouvrir le benzylidène et finalement benzyler en C4. Ces trois étapes ont été remplacées par les deux étapes illustrées au schéma 19.

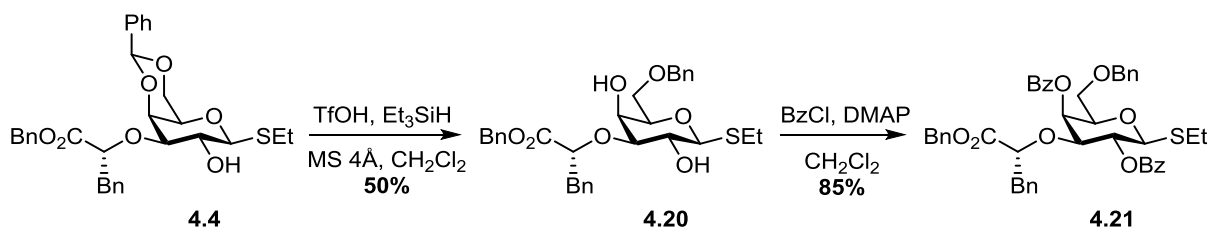


Schéma 19. Deux dernières étapes de la synthèse du résidu galactose

La première de ces deux étapes consiste en l'ouverture réductrice sélective d'un benzylidène. L'ouverture régiosélective d'un acétal cyclique a été rapportée pour la première fois en 1951 par Doukas et Fontaine¹³⁰, puis a été étudiée plus en profondeur par Eliel et Rerick^{131,132} quelques années plus tard. En 1969, Bhattacharjee et Gorin¹³³ sont les premiers à appliquer les ouvertures sélectives de benzylidènes à la chimie des carbohydrates en utilisant LiAlH_4 et AlCl_3 . Cette technique a été étudiée plus tard par Lipták et al.^{134,135} Depuis, plusieurs combinaisons de réactifs ont été découvertes pour l'ouverture sélective des 4,6-benzylidènes. Pour obtenir sélectivement le 4-O-Bn, il est possible d'utiliser, entre autres, $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ ¹³³, $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_3\text{-AlCl}_3$ ^{136,137} et $\text{BH}_3\cdot\text{THF-TMSOTf}$ ¹³⁸. Parmi les différentes méthodes pour obtenir le 6-O-Bn, on retrouve $\text{NaCNBH}_3\text{-HCl}$ ^{139,140}, $\text{NaCNBH}_3\text{-TFA}$ ¹³⁶, $\text{Et}_3\text{SiH-TFA}$ ¹⁴¹ et $\text{Et}_3\text{SiH-BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ ¹⁴². Sakagami¹⁴³ a rapporté que la combinaison $\text{Et}_3\text{SiH-TfOH}$ offrait de meilleurs

rendements pour obtenir le 6-O-Bn lors de la synthèse de leur mimétique du sLe^X. C'est cette méthode qui a été utilisée pour l'ouverture du benzyldène **4.4**. Le rendement moyen de 50% pourrait être expliqué par la présence d'un hydroxyle libre sur le substrat, puisqu'il a déjà été remarqué que cela affectait la régiosélectivité et favorisait la formation du produit d'hydrolyse.^{144,145} L'utilisation de Et₃SiH-TFA sur notre molécule donnait des rendements semblables, mais utilisait une plus grande quantité de réactifs et n'a donc pas été favorisé. Plus récemment, une nouvelle méthode¹⁴⁶ employant Et₃SiH avec I₂ a été rapportée comme étant plus versatile et efficace pour l'ouverture menant au 6-O-Bn. Il serait intéressant d'utiliser notre substrat comportant un hydroxyle libre afin de voir si l'on obtient un meilleur rendement. Avec **4.20** en main, il ne reste que la protection des deux hydroxyles libres par des benzoates afin d'obtenir le résidu galactose **4.21** complété.

4.3. Synthèse de la moitié Fucose-Tartrate

Le second bloc de la molécule est la moitié fucose-tartrate **4.40a** ou **4.40b**. Le défi synthétique de ce fragment est la différenciation des deux esters du tartrate afin d'installer une chaîne comportant un azoture qui permettra plus tard d'allonger cette chaîne. La rétrosynthèse de **4.40a** et **4.40b** est illustrée au schéma 20.

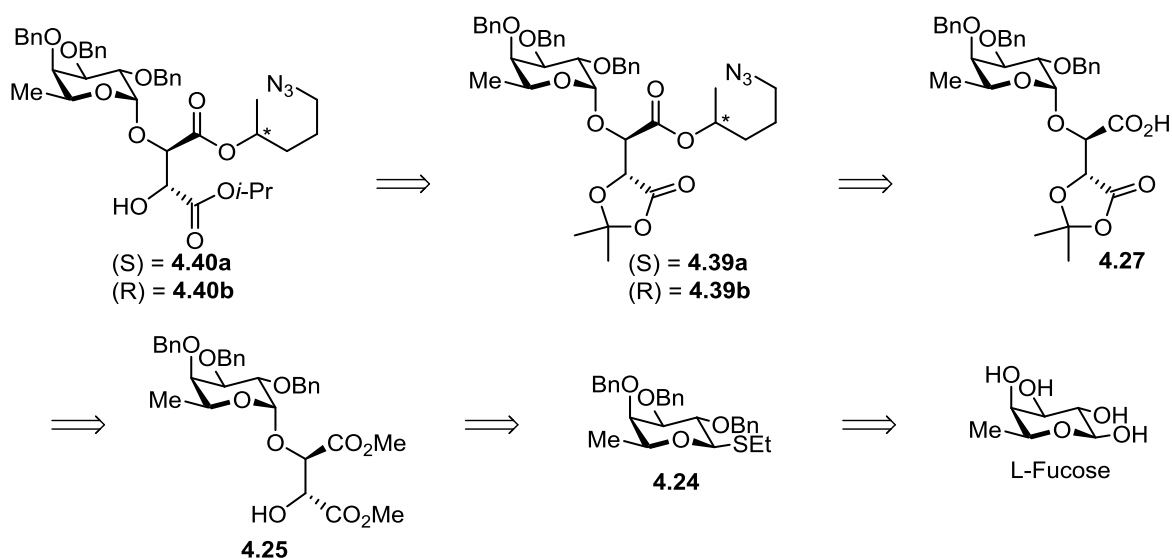


Schéma 20. Rétrosynthèse de la moitié fucose-tartrate

4.3.1. Synthèse du résidu fucose

La synthèse du résidu fucosidique **4.25**¹⁰⁴ (Schéma 21) débute par l'acétylation des quatre hydroxyyles du L-fucose pour obtenir **4.22**. Ce dernier est par la suite engagé dans une thioglycosylation en présence d'éthanethiol et de l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ afin de former le thioéther **4.23** dans un ratio 15 : 1 en faveur de l'anomère β grâce à la participation anchimérique de l'acétate en C2. Puisque **4.25** doit être de configuration α , cela nécessite que le groupement en C2 ne soit pas un groupement participant. Pour ce faire, les acétates de **4.23** sont clivés, puis

les hydroxyles libres résultants sont protégés par des benzyles dans le but d'obtenir **4.24**. Ce dernier est utilisé comme donneur de glycosyle dans une réaction de glycosidation avec le L-tartrate diméthyle ester comme accepteur et NIS/TfOH comme promoteurs. Un ratio de 4 : 1 à été obtenu en faveur de l'anomère α . Avec l'intermédiaire **4.25** en main, les deux groupements esters doivent maintenant être différenciés.

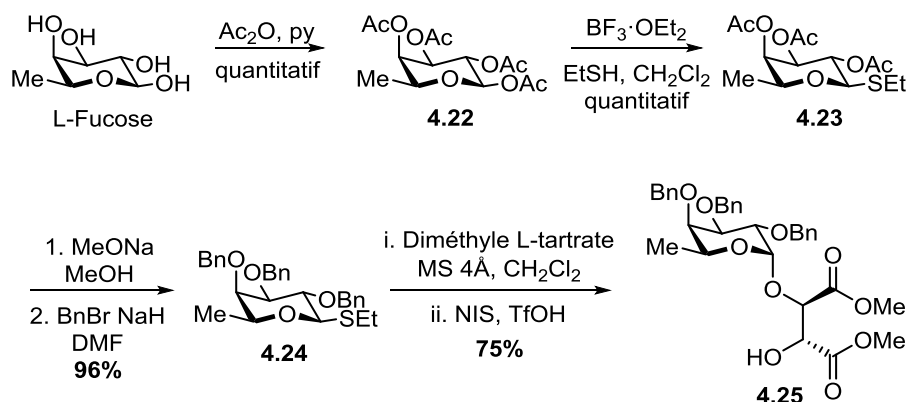


Schéma 21. Synthèse du résidu fucosidique **4.25**

4.3.2. Différentiation des esters du tartrate

Le diacide **4.26** est obtenu suite à la saponification de **4.25** afin de libérer les deux acides carboxyliques (Schéma 22). Un des défis de la synthèse de nos analogues est la différenciation de ces deux acides carboxyliques. Il est possible de prendre avantage de la fonction alcool en α de l'un des deux acides afin de générer une dioxolanone. La formation de la dioxolanone **4.27** a été précédemment rapportée par notre groupe ainsi que la preuve de structure.¹⁰⁵ Les conditions de réaction rapportées sont l'utilisation d'un large excès de 2,2-dimethoxypropane et une quantité catalytique de PTSA dans le dichlorométhane à température pièce pour 32 heures. Le temps de réaction de 32 heures n'est pas souhaitable, mais la réaction n'est pas complète

avant ce temps et le produit se décompose si on laisse la réaction durer plus longtemps. Il a donc fallu trouver de nouvelles conditions afin d'optimiser cette transformation.

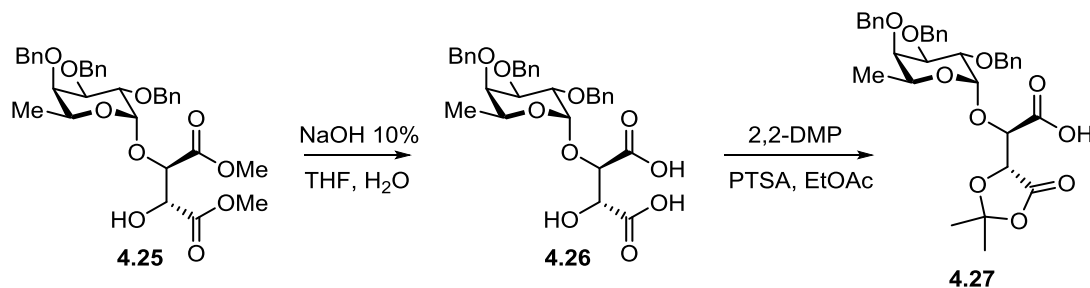
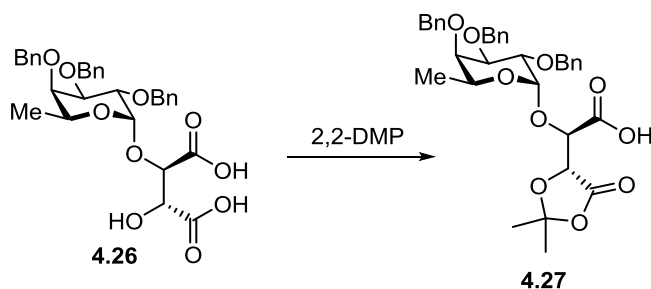


Schéma 22. Deux étapes menant à **4.27** à partir de **4.25**

L'optimisation de la formation de la dioxolanone **4.27** est décrite au tableau 5. N'étant pas très stable sur silice pour une purification, la dioxolanone est utilisée brute suite à une filtration sur silice dans une réaction d'estérification de Steglich. Ainsi le rendement décrit est celui obtenu après cette seconde réaction. L'entrée 1 rapporte les conditions déjà utilisées. Dans le but de réduire le temps de réaction et d'augmenter le rendement, des conditions utilisant CuCl₂ dans l'acétone avec 1.7 équivalent de 2,2-diméthoxypropane¹⁴⁷ ont été essayées. Après 6 heures, il n'y avait plus de produit de départ, mais il n'y avait aucune trace de produit désiré (Entrée 2). Finalement d'autres conditions semblables aux conditions initiales, mais cette fois-ci dans l'acétate d'éthyle à reflux¹⁴⁸ a permis d'obtenir **4.27** en 16 heures. Le résidu brut de cette expérience est plus propre qu'avec les conditions initiales et un rendement supérieur est obtenu lors de l'étape suivante (Entrée 3). Une dioxolanone brute et une autre ayant été passée sur une couche de silice ont été comparées et les résultats de couplages obtenus sont similaires avec une légère augmentation du rendement pour le mélange brut. Ainsi, avec cette optimisation, il a été possible de diminuer le temps de réaction, augmenter le rendement et éliminer l'étape de la filtration sur silice.

Tableau 5. Optimisation de la formation de la dioxolanone **4.27**



Entrée	Réactifs	Solvant	T°	Temps	Rendement ^a
1	PTSA (2%)	CH ₂ Cl ₂ (0.1 M)	tp	32 h	25-35 %
2	CuCl ₂ ·2H ₂ O (10%)	Acétone (0.25 M)	tp	6 h	-
3	PTSA (1%)	EtOAc (0.3 M)	75°C	16 h	44 %

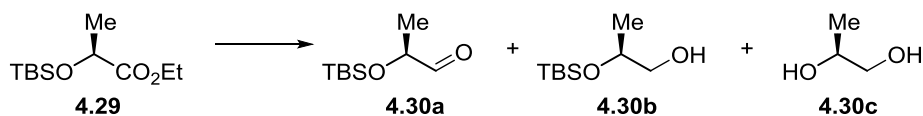
^aSur deux étapes

Le fragment qui est couplé à **4.27** est important, puisqu'il permettra d'incorporer des motifs structuraux importants plus tard dans la synthèse. Ce petit fragment doit être synthétisé en plusieurs étapes, puisqu'il n'est pas disponible commercialement.

4.3.3. Synthèse des chaines latérales

La synthèse de **4.28a** requiert huit étapes à partir du L-lactate d'éthyle (Schéma 23). En premier, il a été considéré l'usage du groupement protecteur TBS, mais celui-ci entraînait un problème pour la réduction de l'ester **4.29** (Tableau 6). En effet, les TBS n'étant pas compatibles avec le réactif LiAlH₄, l'utilisation du réducteur DIBAL-H mène à un mélange de l'aldéhyde **4.30a** et des alcools **4.30b** et **4.30c**. De plus, le produit de départ est récupéré si on utilise LiBH₄. Ainsi, nous avons décidé d'installer un groupement benzyle afin de protéger la fonction alcool.

Tableau 6. Tentative de réduction de l'ester **4.29** comportant un groupement TBS



Entrée	Réactif	Solvant	T°	Temps	Résultat
1	DIBAL-H (1.3 éq.)	CH ₂ Cl ₂	-40°C	2 h	4.30a : 4.30b : 4.30c (5 : 2 : 1) ^a
2	DIBAL-H (3 éq.)	CH ₂ Cl ₂	-40°C	2 h	4.30a : 4.30b : 4.30c (3 : 1 : 1) ^a
3	DIBAL-H (1.3 éq.)	Hexanes	-78°C	3 h	4.30a : 4.30b : 4.30c (8 : 2 : 1) ^a
4	LiBH ₄ (0.75 éq.)	CH ₂ Cl ₂	0°C	1.5 h	Produit de départ 4.29

^aRatio déterminé par ¹H RMN

La première étape de la synthèse (Schéma 23) consiste à benzyler l'alcool libre du lactate d'éthyle en conditions acide avec le trichloroacétimide de benzyle en présence d'acide triflique pour obtenir **4.31a**. Cette étape nécessite une purification assez facile et elle est la seule qui est nécessaire jusqu'à la dernière étape. L'utilisation de l'hydruire de sodium et du bromure de benzyle a été envisagée, puisque ces conditions ne demandaient pas de purification avant la dernière étape. Ceci étant dit, ces conditions peuvent potentiellement épimériser le centre chiral de la molécule et cela n'est pas souhaitable. La seconde étape est la réduction de l'ester en alcool par LiAlH₄. S'en suit une réaction one-pot d'une oxydation au periodinane de Dess-Martin suivi d'une oléfinatation utilisant un réactif de Wittig stabilisé, ce qui mène à l'intermédiaire **4.33a**. Cette réaction est très efficace à petite échelle, mais le prix du periodinane de Dess-Martin étant relativement élevé, une alternative moins couteuse a été utilisée lorsqu'effectuée sur grande échelle. Dans ce cas-ci, en deux étapes, on effectue une oxydation de Parikh-Doering en mettant l'alcool généré par la réduction de **4.31a** en présence de diméthylsulfoxyde, de complexe trioxyde de soufre-pyridine et de triéthylamine, suivi des conditions de la Wittig stabilisée. L'hydrogénation de **4.33a** en présence de pyridine permet de réduire sélectivement la liaison double sans cliver le benzyle présent sur la molécule. La réduction de l'ester par LiAlH₄ mène

à l'obtention d'un alcool primaire. Ce dernier réagit avec le chlorure de méthanesulfonyle en présence d'une base comme la triéthylamine afin de former le mésylate **4.36a**. Celui-ci est par la suite déplacé par l'azoture de sodium et finalement, le groupement benzyle est clivé en présence de TiCl_4 pour générer **4.38a**. La déprotection est effectuée avec TiCl_4 et non pas par hydrogénation en raison de la présence de l'azoture qui serait transformé en amine. Puisque nous sommes intéressés à faire les analogues des deux configurations du méthyle, l'énantiomère de **4.38a**, soit **4.38b** a aussi été synthétisé de la même façon en partant du D-lactate d'éthyle.

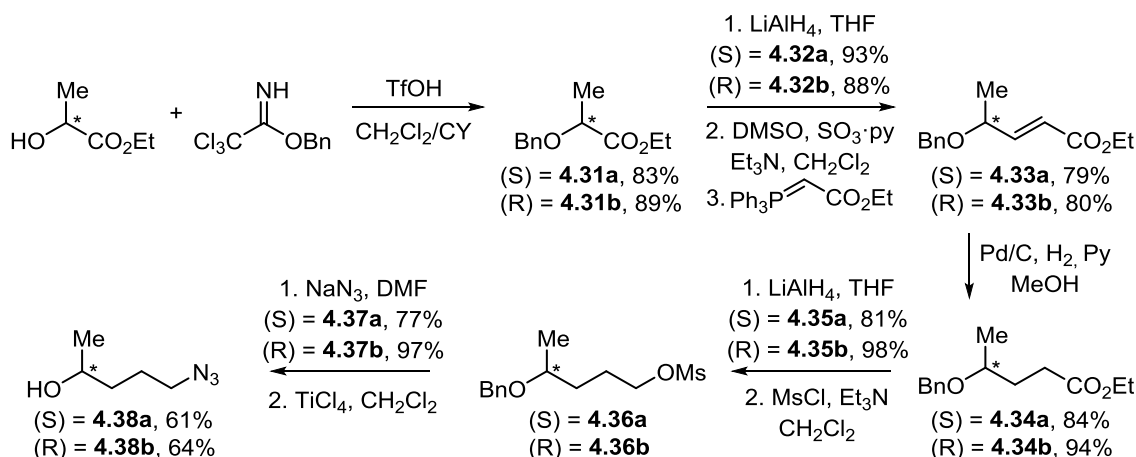


Schéma 23. Synthèse des fragments énantiomères **4.38a** et **4.38b**

4.4. Fin de la synthèse des analogues (R) et (S)

4.4.1. Estérification et glycosylation du résidu fucose-tartrate au résidu

galactose

La dioxolanone **4.27** est convertie en **4.39a** ou en **4.39b** par une estérification de Steglich en utilisant respectivement le fragment **4.38a** ou **4.38b**. Les analogues (S) sont alors préparés en utilisant **4.38a** et les (R) en utilisant **4.38b**. L'hydrolyse acide suivie d'une estérification de

l'acide carboxylique en présence de carbonate de césium et le 2-iodopropane permet d'obtenir les moitiés fucose-tartrate **4.40a** et **4.40b** (Schéma 24).

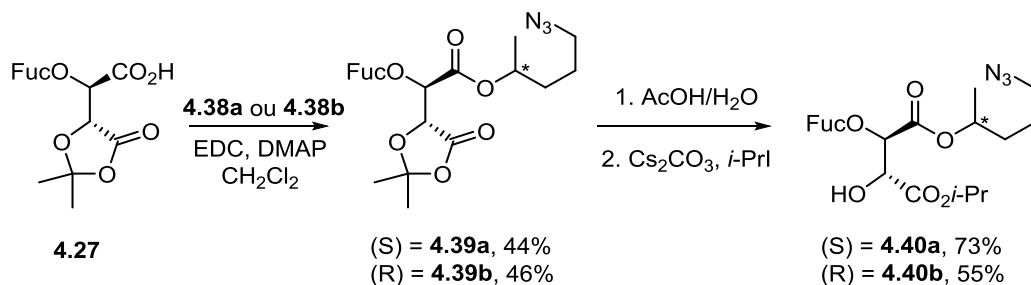


Schéma 24. Synthèse de l'intermédiaire **4.40** à partir de la dioxolanone **4.27**

Les intermédiaires fucose-tartrate sont utilisés comme accepteurs dans une réaction de glycosylation avec le galactoside **4.21** comme donneur. Grâce à l'assistance anchimérique du benzoate en C2 du galactose, on obtient **4.41a** et **4.41b** ayant un lien glycosidique β (Schéma 25).

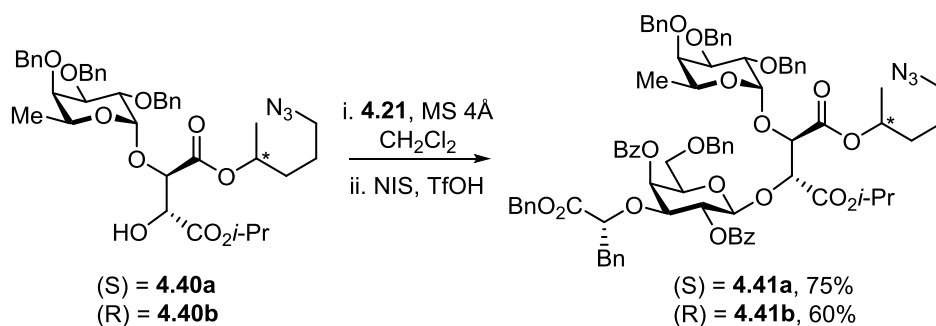


Schéma 25. Glycosylation du galactoside **4.21** avec la moitié fucose-tartrate **4.40**

4.4.2. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen est une réaction permettant la formation d'un hétérocycle à cinq atomes lorsqu'un composé dipôle 1,3 réagit avec un dipolarophile. La cycloaddition de Huisgen la plus fréquente est la réaction entre un alcyne et un azoture. Les conditions développées initialement employant des températures élevées conduisent à la formation d'un mélange des isomères 1,4 et 1,5 (Schéma 26).¹⁴⁹

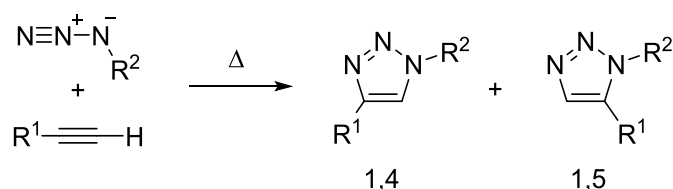


Schéma 26. Cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azoture

C'est en 2002 que Sharpless¹⁵⁰ et Meldal¹⁵¹ introduisent l'utilisation de sels de cuivre(I) comme catalyseurs de cycloaddition entre un alcyne et un azoture. Cette réaction permet l'obtention exclusive du 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué, et ce, avec des temps de réaction et des températures moindres. Sharpless fut le premier à proposer un mécanisme (Schéma 27) pour la réaction de cycloaddition alcyne/azoture catalysée par le cuivre (CuAAC¹⁵²). Celui-ci consiste en 5 étapes impliquant un atome de cuivre et qui passe par l'intermédiaire métallacycle de cuivre(III) à six membres avant de subir une contraction menant au triazole de cuivre, suivi d'une protodémétallation.

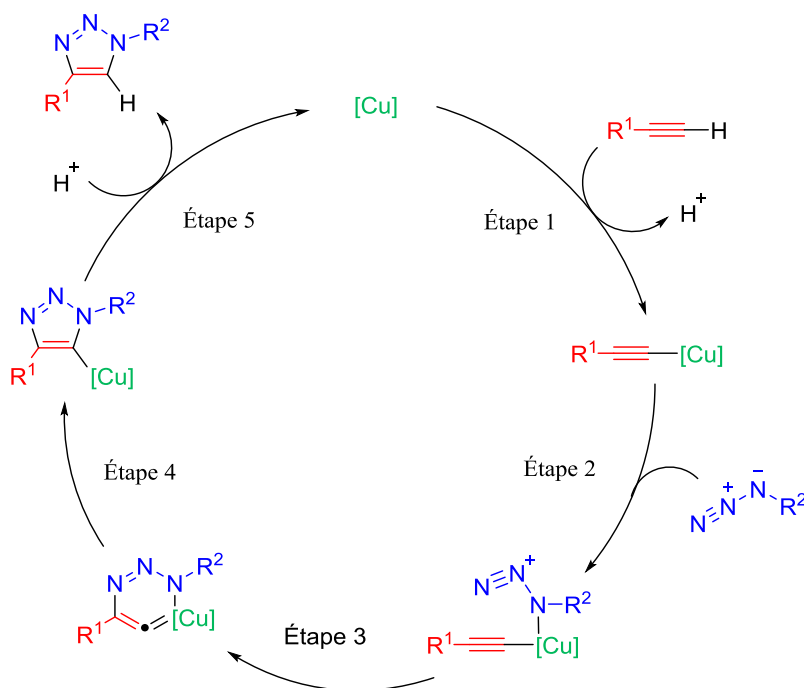
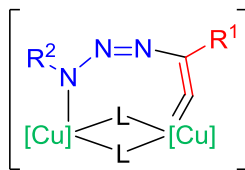


Schéma 27. Mécanisme de la CuAAC proposé par Sharpless^{150,153}

Par la suite, des études mécanistiques effectuées par les groupes de Fokin et Finn ont démontré que la réaction est d'ordre 2 par rapport à la concentration de cuivre(I).^{154,155} Ceci suggère que deux atomes de cuivre sont impliqués dans l'état de transition de l'étape limitante. À donc été proposé un autre mécanisme bimétallique passant par l'intermédiaire **4L** (Figure 29).¹⁵⁶



4L

Figure 29. Intermédiaire impliquant deux atomes de cuivre dans le mécanisme proposé par Fokin et Finn en 2005¹⁵⁵

Suite à d'autres études DFT,^{157,158} ainsi que des études d'échange isotopique du cuivre,¹⁵⁹ Fokin présente en 2013 une nouvelle proposition de mécanisme impliquant aussi deux atomes de cuivre (Schéma 28).^{159,160} Bien que le mécanisme de cette réaction reste toujours de l'ordre de la spéculation, son utilisation n'en est pas moins limitée. En effet, la réaction de CuAAC est largement utilisée au sein de la chimie organique grâce à sa biocompatibilité, sa versatilité, sa simplicité, sa rapidité, sa reproductibilité et puisqu'elle donne accès à une variété d'hétérocycles.

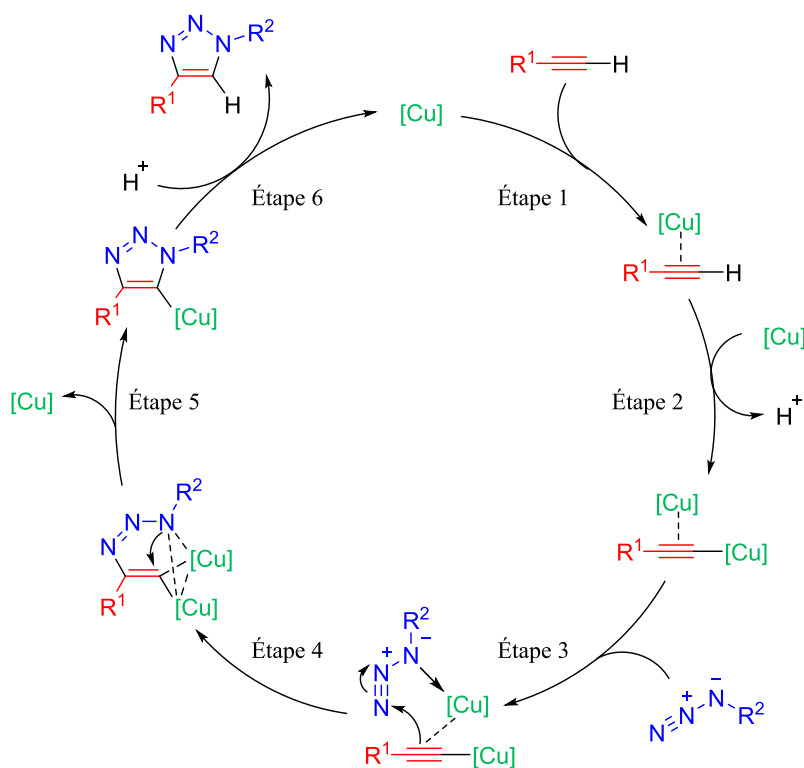


Schéma 28. Mécanisme de la réaction de CuAAC proposé par Fokin en 2013¹⁵⁹

Le sulfate de cuivre et l'iodure de cuivre sont très souvent utilisés comme catalyseurs pour la réaction de CuAAC.¹⁶¹ Plusieurs conditions avec ces derniers ont été testées sur des substrats modèles, soit l'azoture **4.38a** et l'alcyne **4.42** (Tableau 7). L'utilisation de 2.1

équivalents d'iodure de cuivre en combinaison avec 3.2 équivalents de DIPEA a mené à l'obtention du produit **4.44** (Figure 30) confirmé par HRMS (Entrée 1). La diminution à 0.2 équivalent de cuivre a conduit à un mélange de **4.44** et du produit désiré **4.43** (Entrée 2).

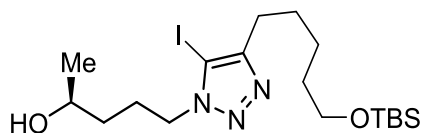
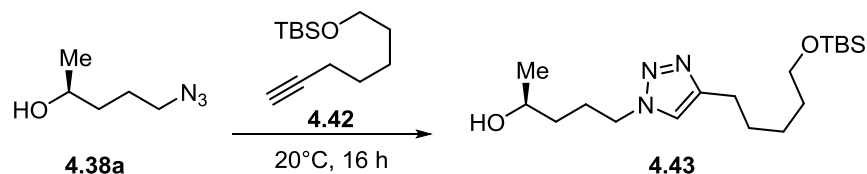


Figure 30. Structure du produit **4.44**

Des conditions rapportées par Hu¹⁶² ont été essayées et il a été possible d'isoler **4.43** avec 60% de rendement (Entrée 3). L'utilisation de l'acide acétique en quantité catalytique équivalente à celle de DIPEA permet d'accélérer la conversion des intermédiaires contenant des liens C-Cu et de tamponner la basicité de DIPEA. L'utilisation du sulfate de cuivre en présence d'ascorbate de sodium mène aussi à la formation du produit désiré **4.43** avec un rendement de 52% (Entrée 4). Ainsi, nous avons retenu les conditions A (Entrée 3) et B (Entrée 4) pour faire la cycloaddition sur les substrats d'intérêts.

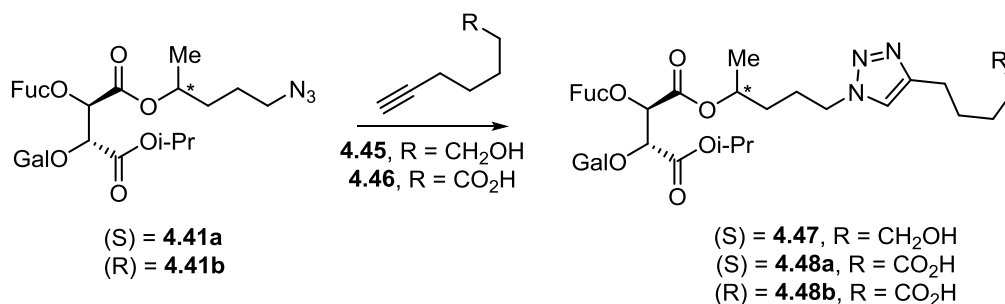
Tableau 7. Optimisation des conditions de CuAAC sur des substrats modèles



Entrée	Réactifs	Solvant	Rendement
1	4.42 (1.1 éq.) CuI (2.1 éq.), DIEA (3.2 éq.)	THF 0.1 M	4.44
2	4.42 (1.1 éq.) CuI (0.2 éq.), DIEA (2.1 éq.)	THF 0.1 M	Mélange de 4.44 et 4.43
3	4.42 (1.05 éq.), CuI (4 mol%) DIEA (8 mol%), AcOH (8 mol%)	CH ₂ Cl ₂ 1 M	60%
4	4.42 (1.1 éq.), CuSO ₄ (0.3 éq.) Na L-Ascorbate (0.3 éq.)	THF/H ₂ O 3:1 0.1 M	52%

Les conditions A et B ont été testées sur nos intermédiaires avancés (Tableau 8). L'azoture **4.41a** avec l'alcyne **4.45** mène à de meilleurs rendements avec les conditions B (Entrée 2) que les conditions A (Entrée 1). La même tendance est observée si l'alcyne **4.46** est utilisé (Entrées 3-4). Ainsi, les conditions B (CuSO₄, ascorbate de sodium) ont été choisies pour la synthèse de nos molécules **4.47** et **4.48a**. Le produit **4.48b** a donc été aussi synthétisé avec ces conditions (Entrée 5).

Tableau 8. Différentes conditions de CuAAC avec différents alcynes



Entrée	Substrat	Alcyne	Conditions ^a	Produit	Rendement
1	4.41a	4.45	A	4.47	65 %
2	4.41a	4.45	B	4.47	73 %
3	4.41a	4.46	A	4.48a	78 %
4	4.41a	4.46	B	4.48a	91 %
5	4.41b	4.46	B	4.48b	86 %

^aConditions A : CuI (4 mol%), DIPEA (8 mol%), AcOH (8 mol%), CH₂Cl₂ 1 M, 24 h, 20°C.
Conditions B : CuSO₄ (0.3 éq.), Na L-ascorbate (0.3 éq.), 24 h, 20°C, suivi de AcOH (1.0 éq.) 1 h.

4.4.3. Couplage avec différents nucléophiles

Avec les intermédiaires **4.48a** et **4.48b** en main, il est possible de compléter la synthèse de plusieurs analogues en deux étapes, soit un couplage avec différents nucléophiles, puis la déprotection des benzyles. Il est à rappeler que l'objectif de cette nouvelle génération

d'analogues est d'introduire un groupement chargé négativement qui interagirait favorablement à l'endroit où se lie les tyrosines sulfatées de PSGL-1 sur la sélectine P, soit une surface globalement positive. Il aurait été possible d'introduire des nucléophiles comportant des groupements sulfates, mais ces derniers sont difficiles à synthétiser et ont une stabilité limitée. Le groupe de Bewley a publié une étude en 2008 dans laquelle ils démontrent qu'une tyrosine sulfate peut être remplacée par une tyrosine sulfonate sur la protéine CCR5 tout en gardant la même affinité avec son ligand.¹⁶³ Ainsi, le méthylène sulfonate ($-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$) serait un bon isostère au sulfate ($-\text{OSO}_3\text{Na}$).

Nous avons donc commencé à explorer différents sulfonates à coupler sur **4.48a** et **4.48b**. La taurine, en tant que sulfonate acylique a été couplé afin d'obtenir **4.49a** et **4.49b**. Pour la synthèse de motifs qui ressemblent davantage à une tyrosine sulfate, des sulfonates aromatiques commerciaux soit le 4-hydroxybenzène sulfonate de sodium, le 4-aminobenzène sulfonate de sodium ont aussi été couplés pour obtenir **4.52a**, **4.53a** et **4.53b**. Des sulfonates aliphatiques comportant un cycle aromatique ayant été synthétisé comme le (4-aminophényle)méthanesulfonate de sodium et le 3-(4-aminophénoxy)propane-1-sulfonate de sodium permettent d'obtenir respectivement les composés **4.54a**, **4.54b**, **4.51a** et **4.51b**. D'autres nucléophiles possédant des fonctions anioniques comme le 8-aminonaphthalène-1,3,6-trisulfonate de sodium et le 4-aminophenyl phosphate de sodium ont été couplés avec notre substrat et ont permis d'obtenir respectivement **4.55a**, **4.55b**, **4.50a** et **4.50b**. De plus, nous avons introduit deux tyrosines protégées différemment (**4.56a** et **4.57a**).

Il existe plusieurs agents de couplage efficaces pour la réaction entre un acide carboxylique et une amine ou un alcool (DCC, EDC, HOBt, PyBOP, HATU, etc.). Dans notre cas, HATU a été utilisé et a montré des résultats satisfaisants (Schéma 29). Cette réaction de

couplage peptidique se fait à température pièce, sauf pour **4.56** qui nécessite de chauffer à 55°C pour obtenir un bon rendement. Dans les autres cas, chauffer entraîne plutôt la dégradation du produit en clivant le fucose. Un problème récurrent lors de cette réaction est l'obtention du produit sous forme d'un mélange de sels, dont un sel de diisopropyléthylamine. Afin d'obtenir le sel de sodium, le produit doit être traité avec de la résine échangeuse d'ions fournissant des ions sodium.

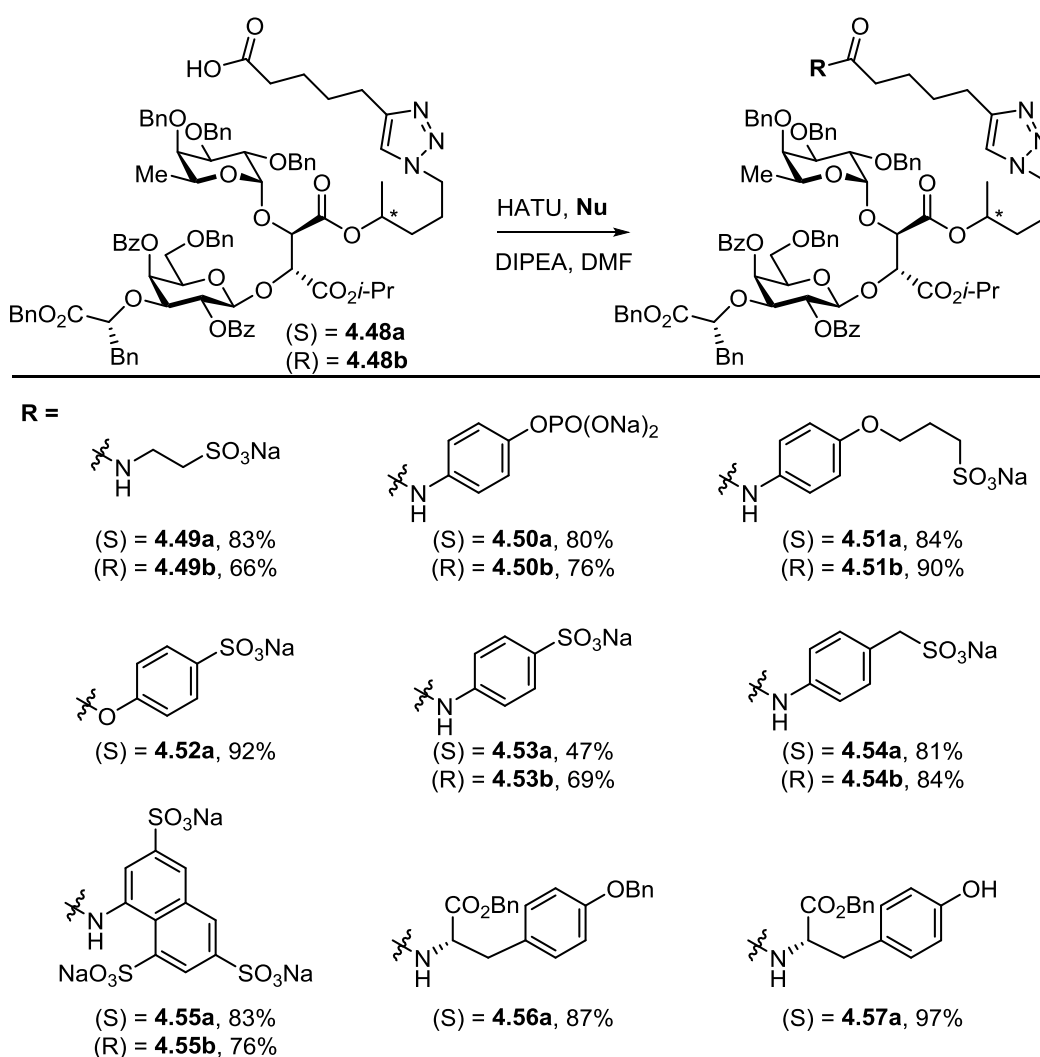
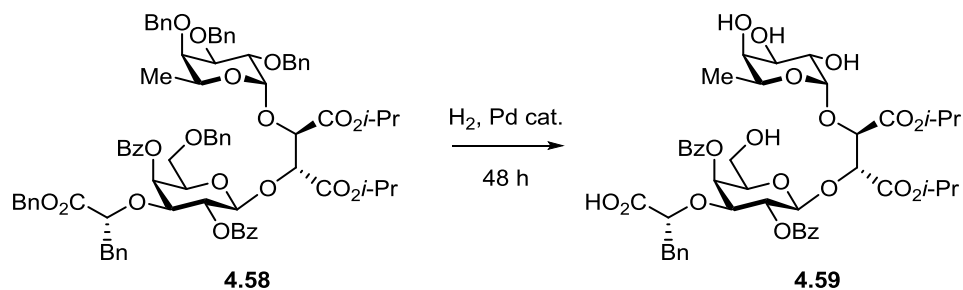


Schéma 29. Couplage peptidique de **4.48a** et **4.48b** avec différents nucléophiles

4.4.4. Déprotection finale des analogues

La dernière étape de la synthèse consiste en la déprotection des groupements protecteurs. Une hydrogénation est considérée afin de cliver les benzyles de nos substrats. Différentes conditions ont été essayés sur un substrat modèle **4.58** (Tableau 9) dont le produit d'hydrogénation **4.59** a déjà été caractérisé.⁶³ L'utilisation du palladium sur charbon dans le dioxane a mené à l'observation d'un mélange de produits complexe par RMN après un temps de réaction de 48h (Entrée 1). Ces produits doivent être un mélange de produits partiellement déprotégés. Un mélange de produits similaire est aussi observé en utilisant l'hydroxyde de palladium dans le même solvant (Entrée 2). Afin d'obtenir des conditions d'hydrogénation qui offriraient une meilleure réactivité, nous nous sommes penchés sur la solubilité de l'hydrogène. En effet, l'hydrogène n'est que peu soluble dans le dioxane et ceci pourrait être la raison de la faible réactivité observée. Ainsi, l'hexane a été identifié comme solvant de choix pour l'hydrogénation, puisqu'il possède une solubilité de l'hydrogène supérieure à plusieurs autres solvants.¹⁶⁴ Par contre, la solubilité du produit de départ devient un problème si l'on utilise l'hexanes. C'est pourquoi, un juste milieu entre le dioxane et l'hexane semble pointer en faveur du THF. Effectivement, la déprotection de **4.58** avec l'hydroxyde de palladium effectuée dans le THF est réalisée avec succès (Entrée 3). Seulement le produit désiré est observé par RMN dans le brut réactionnel, ce qui indique une conversion complète. Le faible rendement de 42% est plutôt attribué à la difficulté de purification de ces molécules polaires sur phase inverse.

Tableau 9. Optimisation de l'hydrogénation sur le substrat modèle **4.58**.



Entrée	Catalyseur	Solvant	Rendement
1	Pd/C	Dioxane	Mélange de produits
2	Pd(OH) ₂	Dioxane	Mélange de produits
3	Pd(OH) ₂	THF	42%

Avec ces conditions, il a été possible d'effectuer la déprotection finale de nos analogues (Schéma 30). Tous les analogues (S) ont été hydrogénés avec succès jusqu'au produit final. Les faibles rendements de certaines entrées ne sont pas nécessairement représentatifs d'une mauvaise réactivité ou d'une dégradation, puisque certaines de ces entrées n'ont été faites qu'une seule fois. Pour les analogues (R), qui diffèrent seulement d'une inversion de configuration du méthyle, leur déprotection a été plus difficile. En effet, ce n'est pas le manque de réactivité qui en est la cause, mais l'instabilité des produits. Le composé **4.66b** a été synthétisé, purifié et caractérisé, mais il s'est décomposé très rapidement. Le produit de dégradation est la migration du benzoate en C4 au C6 du galactose. Ce produit possède la même polarité que le produit désiré et est donc inséparable par chromatographie. D'ailleurs, plus le composé était purifié sur phase inverse, plus il subissait de migration. L'utilisation de solutions tampons à pH neutre lors de ces purifications n'ont pas amélioré le résultat. Les produits **4.60b** et **4.61b** ont été synthétisés avec succès avec seulement des traces du produit de migration. Les composés **4.62b** et **4.65b** ont été synthétisés mais se sont dégradés pendant leur purification.

Face à la faible stabilité de ces analogues (R) déprotégés, il a semblé évident de ne pas poursuivre dans la déprotection des autres analogues (R) préparés. En effet, si la molécule se dégrade aussi facilement, elle ne serait pas viable en milieu physiologique.

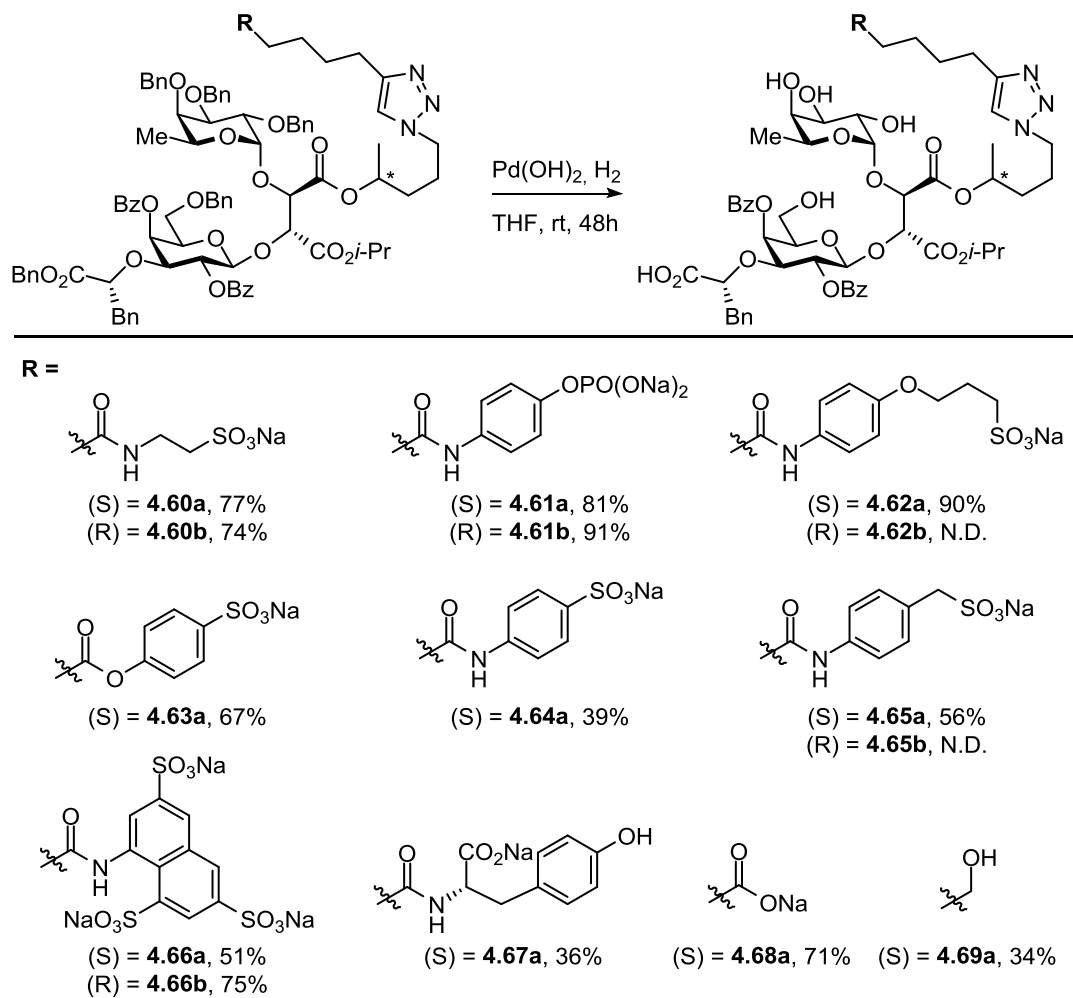


Schéma 30.

Hydrogénation des différents analogues préparés

Il est difficile de conclure pourquoi cette inversion de configuration favoriserait une migration du benzoate. Il est possible que l'orientation du galactose et du fucose soit influencée par cette modification et que l'encombrement autour du benzoate en C4 soit augmenté, favorisant sa migration. De façon contraire, peut-être que l'encombrement en C6 est trop important chez les analogues (S), ce qui minimise la migration du benzoate.

4.4.5. Conclusion

Au total, 13 mimétiques du sLe^x ont été préparés avec succès (Figure 31). Ceux-ci requièrent une voie de synthèse convergente dont la séquence linéaire la plus longue comporte 16 étapes avec un total de 31 à 33 étapes non linéaires. Les différents défis et problèmes associés à la synthèse de ces molécules sont l'alkylation sélective en C3 du galactose, la différenciation des deux esters du tartrate, la manipulation et purification de molécules comportant des sulfonates et phosphates, ainsi que la migration de benzoate observé pour les analogues (R). Les composés synthétisés ont été soumis à plusieurs tests biologiques afin de mesurer leur activité *in vitro* et *in vivo* envers les sélectines. Ces résultats sont présentés au chapitre 5.

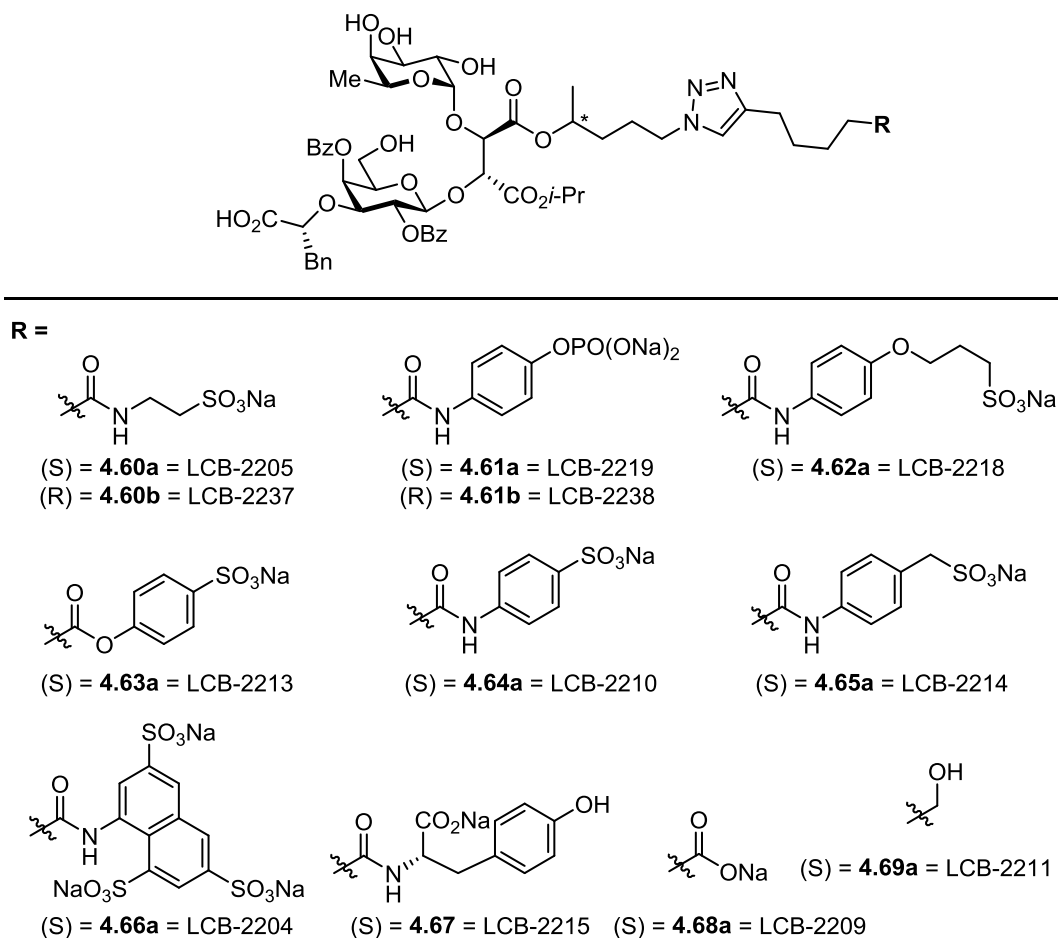


Figure 31. Librairie des mimétiques synthétisés

5. Résultats biologiques et amarrage moléculaire

Les études biologiques des mimétiques synthétisés sont effectuées par l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire et régénération cardiaque du Pr. Mona Nemer à l'Université d'Ottawa. Les résultats présentés dans ce mémoire ne sont que des résultats préliminaires, puisque les tests restent à être optimisés. Trois types de tests biologiques ont été effectués soit une analyse de l'adhésion *in vitro* dynamique utilisant l'appareil Biacore™ (Section 5.1), une analyse *in vitro* statique de l'adhésion cellulaire (Section 5.2) ainsi que le compte de cellules dans le fluide du péritoine inflammé (Section 5.3). Finalement, quelques études d'amarrage (Section 5.4) ont permis d'examiner les modes de liaison possible de certains analogues.

5.1. Test d'adhésion dynamique *in vitro* (Biacore™)

Le Biacore™ est un appareil qui permet de mesurer en temps réel les interactions protéines/protéines ou protéine/ligands en utilisant le principe de la résonance des plasmons de surfaces (SPR). Il y a plusieurs avantages d'utiliser cette technique, dont le fait qu'aucun marqueur n'est requis pour la détection et que les mesures se font de façon dynamique.

5.1.1. Concept

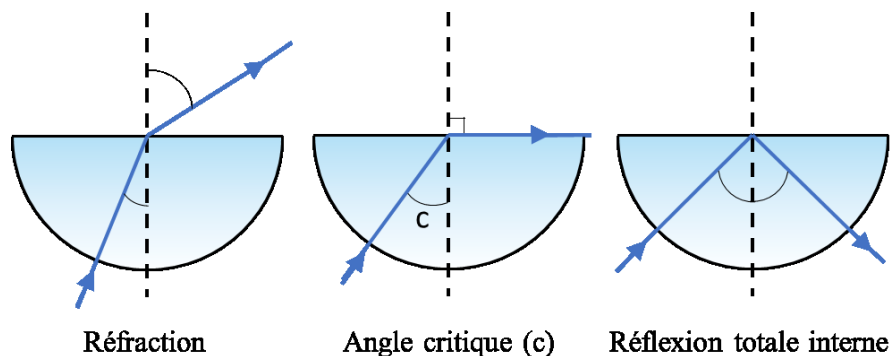


Figure 32. Phénomènes observables lorsqu'un faisceau lumineux est dirigé à travers un prisme semi-circulaire à différents angles.

À partir d'un certain angle incident critique, un faisceau lumineux passant à travers un prisme semi-circulaire est totalement réfléchi à l'intérieur du prisme, ce qu'on appelle la réflexion totale interne (Figure 32). Bien qu'aucune lumière ne sorte de la surface du prisme en réflexion totale interne, le champ électrique des photons réfléchis, quant à lui, s'étend légèrement au-delà de la surface de réflexion. Lorsque le prisme est recouvert d'une mince couche d'or, l'énergie ce champ électrique peut interagir avec des électrons libres sur la surface de la couche d'or. De cette façon, les photons incidents possédant le bon angle peuvent être absorbés et leur énergie transférée aux électrons qui produisent des plasmons de surface. Ces derniers sont en fait les oscillations des charges électriques qui sont générées et qui sont en résonance avec les photons incidents. Ainsi, lorsque les photons sont convertis en plasmons, on observe une diminution intense de la lumière reflétée. On nomme l'angle de résonance des plasmons de surface l'angle auquel il y a eu absorbance (Figure 33).¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

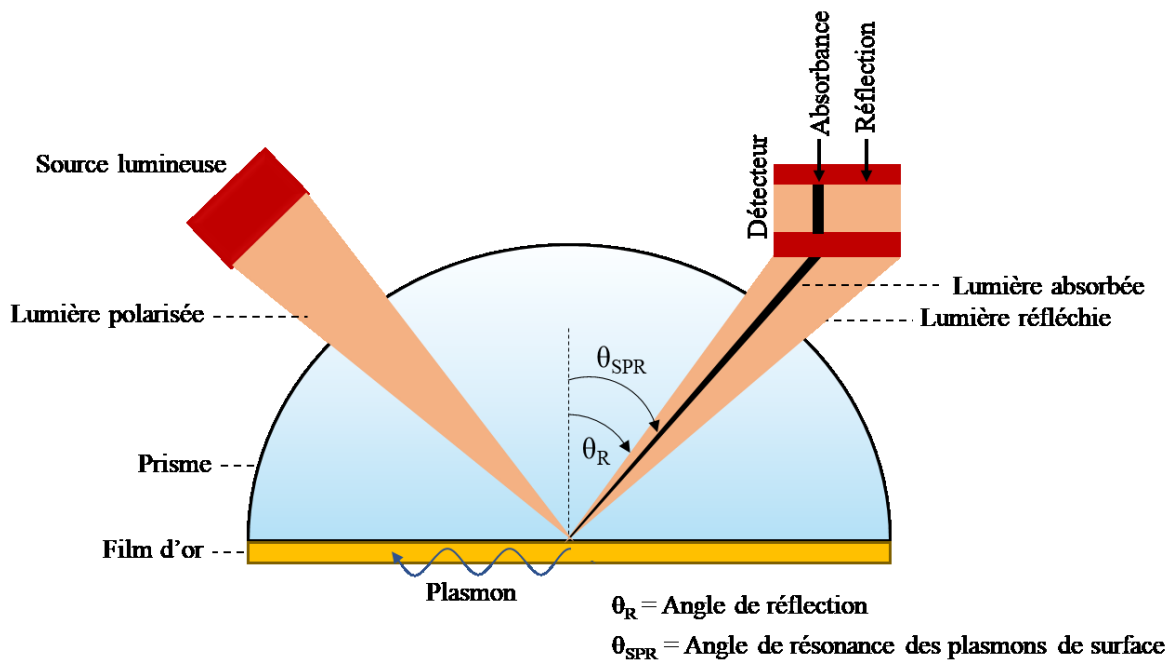


Figure 33. Résonance des plasmons de surface

Les plasmons de surface sont sensibles au moindre changement près de la surface de la couche d'or. Ainsi, l'angle SPR varie lorsque des molécules sont adsorbées sur cette surface. La couche d'or du BiacoreTM est recouverte de dextran permettant la formation de liaison chimique avec le ligand que l'on veut attacher. Puisque l'angle SPR change lorsque les analytes se lient aux ligands (Figure 34A), il est possible de quantifier l'affinité de l'analyte au ligand en convertissant les angles en signal de résonance (Figure 34B). Comme il a été discuté dans le chapitre 1 (Section 1.3), l'affinité ligands/sélectines est augmentée sous les conditions dynamiques du flux sanguin par rapport à des conditions statiques. Le BiacoreTM est ainsi avantageux, puisqu'il permet de reproduire un environnement dynamique analogue au vaisseau sanguin en utilisant une injection à débit continu.

Cette technique permet de mesurer non seulement l'affinité de liaison des analytes, mais aussi les constantes cinétiques, soit la constante de vitesse d'association et la constante de vitesse de dissociation.

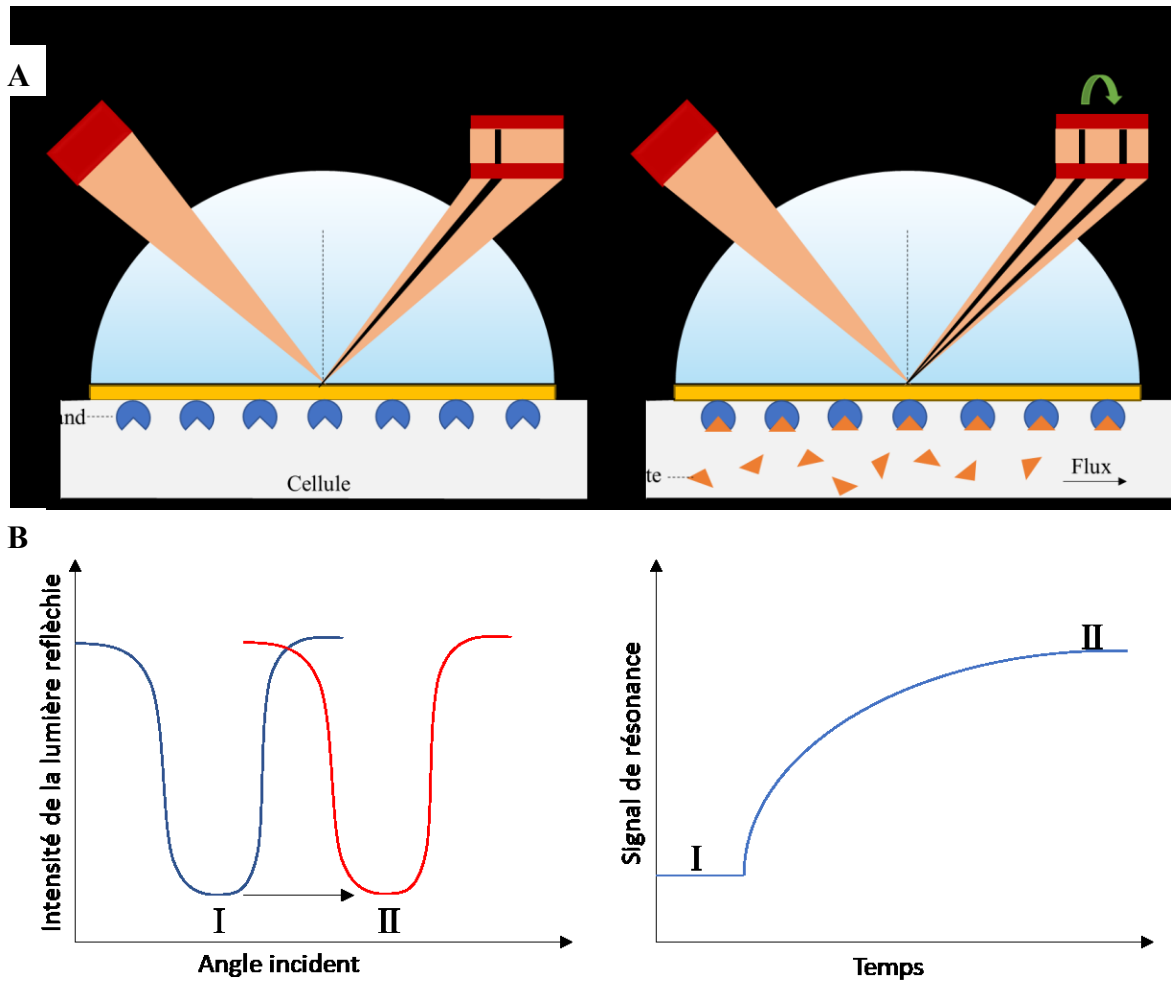


Figure 34. (A) La variation du poids moléculaire sur la feuille d'or est responsable du changement de l'angle SPR. (B) Conversion des angles de SPR en signal de résonance

5.1.2. Détails sur les tests

Les tests utilisant le BiacoreTM sont encore en développement par le Dr. Wael Maharsy (Université d'Ottawa). Le premier test que nous voulions développer est un test de compétition entre nos analogues et PSGL-1 pour la liaison avec les sélectines (Figure 35). Pour ce faire, un anticorps contre la portion Fc de IgG est couplé au capteur puis le monomère PSGL-1-Fc est ajouté et immobilisé par la liaison de Fc à l'anticorps. PSGL-1-Fc est le monomère de PSGL-1 obtenu en clonant la partie extracellulaire de PSGL-1 sans la présence du thiol responsable de sa dimérisation et avec la portion Fc. Lorsqu'une solution de sélectine P est injectée, on obtient une réponse SPR correspondant à 100% d'adhésion avec PSGL-1-Fc. Si un antagoniste est injecté en solution avec la sélectine P, l'antagoniste et la PSGL-1 immobilisée seront en compétition pour lier la sélectine P. Plus l'antagoniste possède une grande affinité avec la sélectine P, moins de sélectines P se lieront aux PSGL-1 du capteur et plus le signal SPR diminuera. Après plusieurs essais, cette expérience n'a pas encore été concluante et il est pensé que cela proviendrait du fait que notre protéine PSGL-1-Fc ne posséderait pas les modifications post-translationnelles appropriées. L'étude de la structure de la protéine PSGL-1-Fc préparée en laboratoire est maintenant sous investigation.

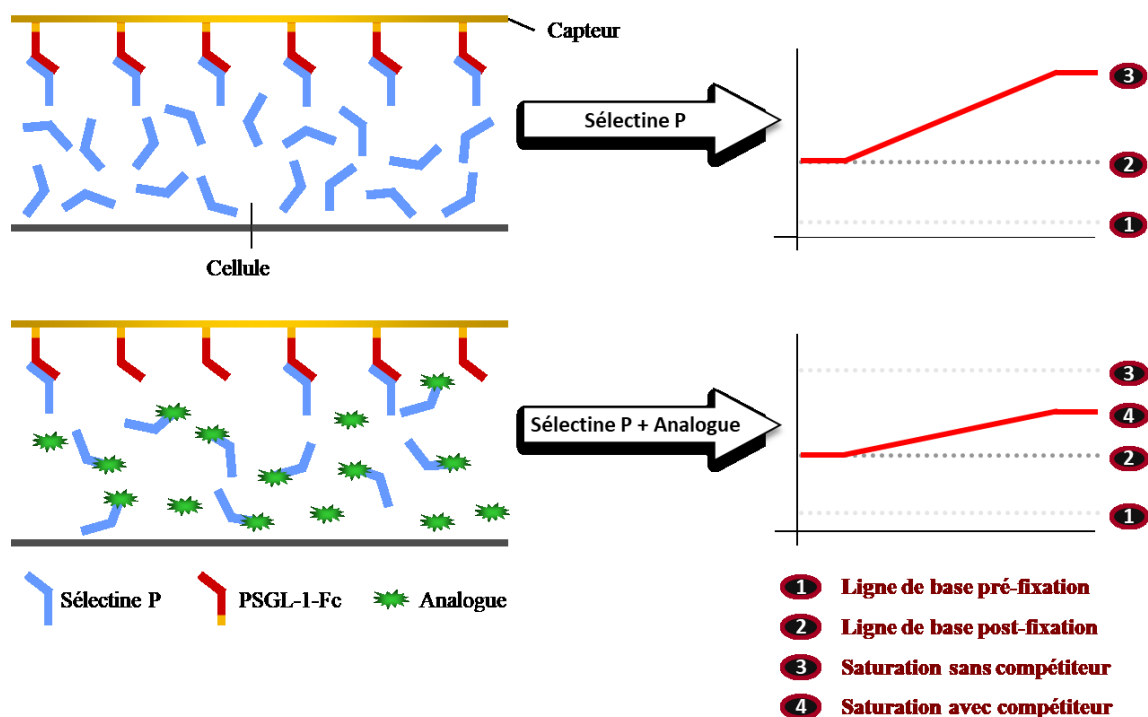


Figure 35. Expérience de compétition par SPR

Le second test permet de mesurer l'affinité entre l'antagoniste et les sélectines (Figure 36). La sélectine P-Fc ou E-Fc sont fixées sur le capteur recouvert de dextran par couplage peptidique en utilisant EDC/NHS. Les antagonistes sont injectés à différentes concentrations afin d'obtenir une réponse SPR en unités de résonance (RU) pour chaque concentration (Figure 36A). Un profil d'affinité est établi en portant en graphique le signal SPR en fonction de la concentration (Figure 36B). Puisque le signal SPR est proportionnel à la masse de la molécule qui se lie au capteur, la réponse doit être corrigée selon les différentes masses molaires des analytes à tester. Cette expérience ne permet pas d'obtenir un IC_{50} , mais elle permet de comparer entre eux les différents analogues préparés ainsi qu'avec sLe^x et LCB-111, notre analogue de la première génération le plus actif.

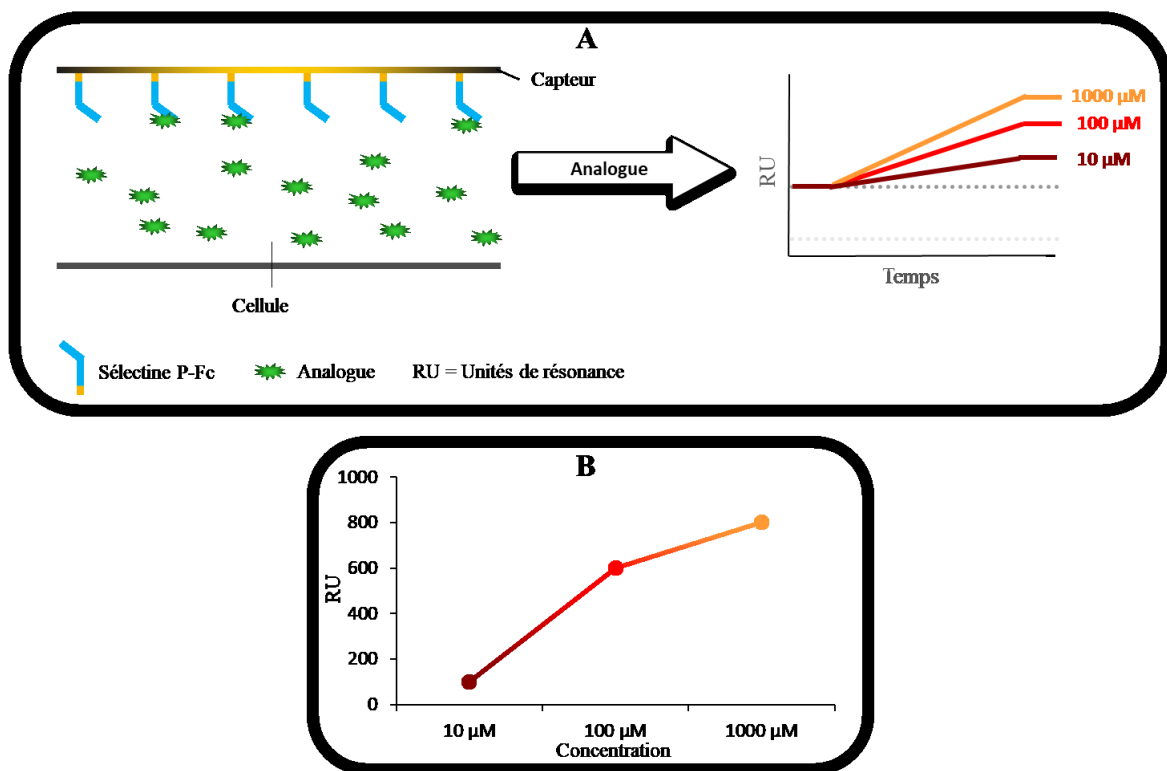


Figure 36. Profil d'affinité entre un antagoniste et P/E-Sel par mesure de signal SPR à différentes concentrations

5.1.3. Résultats

De tous les analogues de configuration (S) ayant été testés, deux ont montré des résultats prometteurs pour ce test. En effet, LCB-2218 et LCB-2219 ont obtenu des profils d'affinité supérieurs à LCB-111 (Figure 37).

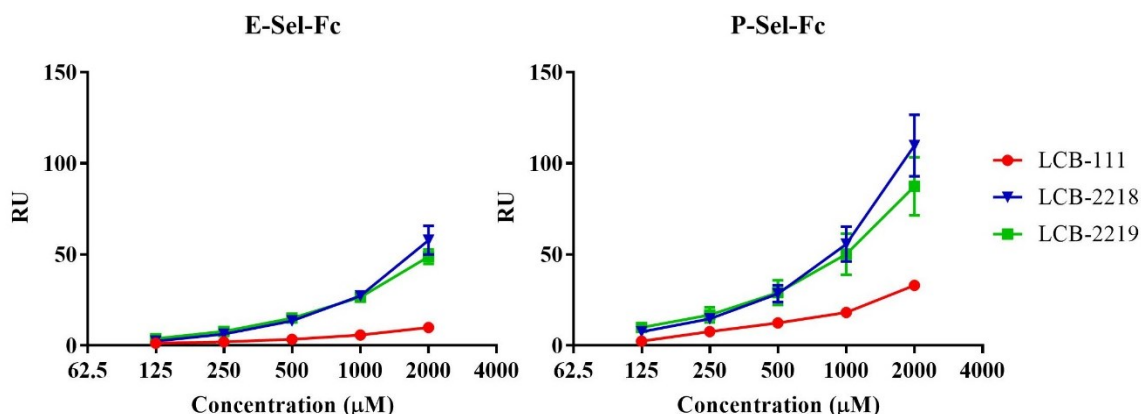
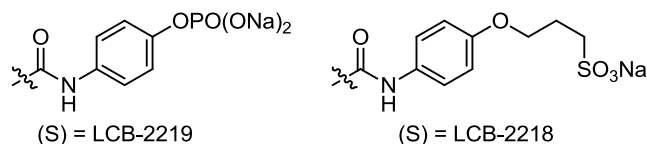


Figure 37. Profils d'affinité de LCB-111, LCB-2218 et LCB-2219

Les deux analogues de configuration (R) qui ont été préparés, soit LCB-2237 et LCB-2238, ont été comparés à leur homologue (S) étant respectivement LCB-2205 et LCB-2219 (Figure 38). LCB-2205(S) possède une faible affinité avec les sélectines E et P, mais l'inversion de la configuration chez LCB-2237(R) a pour effet d'augmenter cette affinité. C'est le contraire qui est observé pour LCB-2219(S) dont l'adhésion est meilleure que pour son homologue LCB-2238(R). Somme toute, Ce sont les analogues de configuration (S) LCB-2218 et LCB-2219 qui offrent une meilleure affinité envers les sélectines lorsque les tests biologiques sont effectués sur le Biacore™. Il serait intéressant de parvenir à synthétiser l'homologue (R) de LCB-2218 afin de vérifier si son activité serait augmentée comme pour LCB-2237.

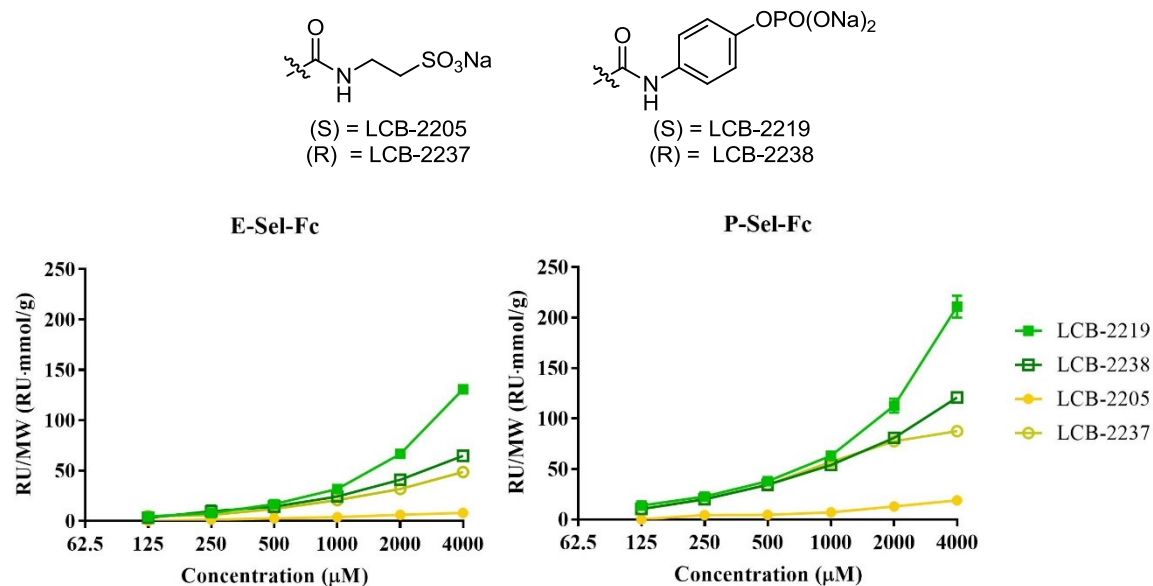


Figure 38. Profils d'affinité avec la sélectine E et la sélectine P

5.2. Test d'adhésion cellulaire statique *in vitro*

Les premiers tests biologiques *in vitro* auxquels ont été soumis nos mimétiques sont des tests d'adhésion cellulaire statiques. Ceux-ci peuvent être séparés en deux sous-catégories, soit les tests d'adhésion cellule-cellule (Schéma 31A) et les tests d'adhésion sélectine-cellule (Schéma 31B). La description de ces expériences et les résultats préliminaires de nos analogues sont discutés dans cette section.

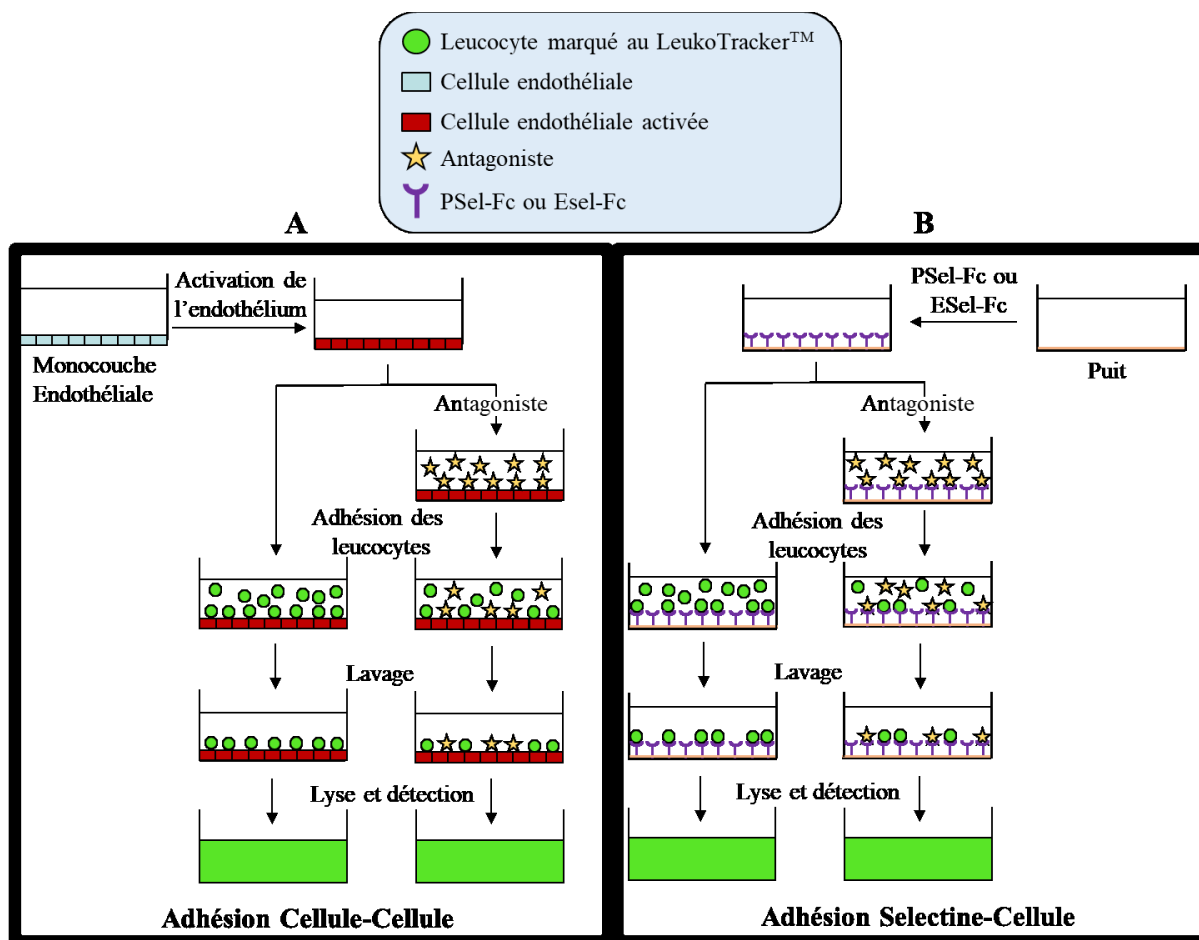


Schéma 31. (A) Test d'adhésion Cellule-Cellule (B) test d'adhésion Sélectine-Cellule

5.2.1. Adhésion cellule-cellule

Le test d'adhésion cellule-cellule est illustré au schéma 31A. Cette technique permet de quantifier l'inhibition d'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales lorsqu'un antagoniste est présent en solution. Pour ce faire, 20 000 cellules endothéliales dermiques microvasculaires humaines (HDMEC) sont ajoutées dans chaque puits enduit de gélatine. Les cellules sont incubées jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche qui est ensuite traitée avec des activateurs de l'inflammation. Dépendamment de l'activateur utilisé, il est possible de

stimuler l'expression des sélectines P ou des sélectines E. En effet, TNF α stimule la production de sélectine E alors que IL-4 stimule l'expression de la sélectine P.¹⁶⁸ Séparément, une suspension de leucocytes (HL-60) est marquée au LeukoTrakerTM. La structure chimique de ce marqueur fluorescent n'est pas divulguée, mais son excitation et son émission sont respectivement à 480 nm et 520 nm. Un contrôle est effectué en ajoutant directement les leucocytes marqués à la monocouche activée afin de quantifier l'affinité des leucocytes avec les sélectines lorsqu'aucun antagoniste n'est pas présent. Pour ce faire, après avoir effectué des lavages pour éliminer les leucocytes n'étant pas liés, on procède à la lyse de la monocouche, puis il est possible de quantifier le nombre de leucocytes grâce à la détection de la fluorescence. Afin de quantifier l'inhibition de l'adhésion des leucocytes, une solution d'antagoniste à tester est ajoutée sur la monocouche d'un autre puits suivi par l'addition des leucocytes marqués. Suite au lavage, la lyse et la détection, on observe une rétention ou une diminution de l'intensité de la fluorescence. Une diminution de l'intensité de fluorescence indique que moins de leucocytes sont liés aux cellules endothéliales, car l'antagoniste occupe certains sites de liaison. Ainsi, la diminution de l'intensité de fluorescence est proportionnelle au pourcentage d'inhibition de l'adhésion.

Les résultats de l'inhibition de l'adhésion de quelques-uns de nos analogues lorsque la sélectine E est exprimée sont présentés à la figure 39. Tout comme pour les résultats du BiacoreTM, LCB-2219 semble être un bon candidat. Toutefois, LCB-2218 ne démontre pas une aussi bonne activité. Ces résultats préliminaires restent à être confirmés par l'obtention d'une reproductibilité, car ce test n'a été fait qu'une fois pour l'instant.

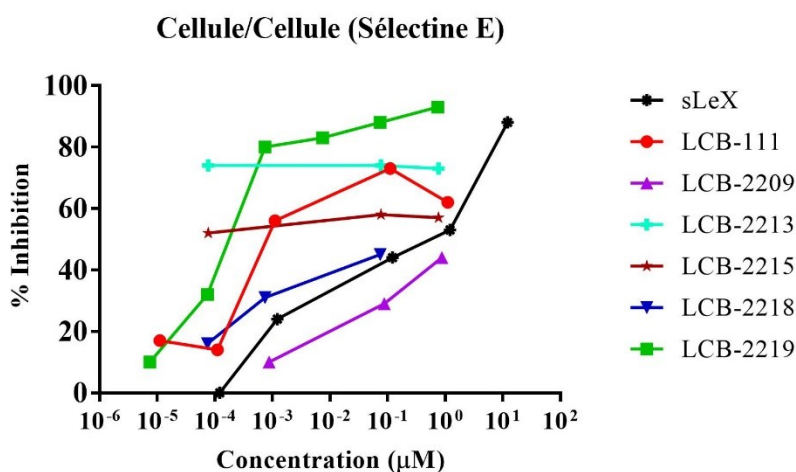
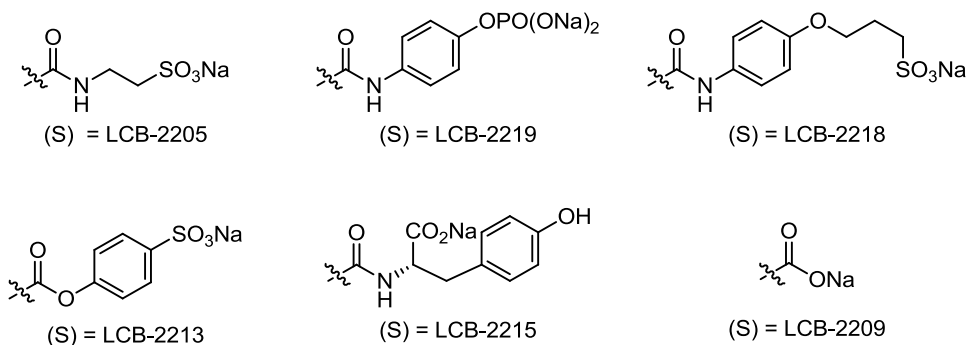


Figure 39. Adhésion cellule-cellule lorsque la sélectine E est exprimée

Certains analogues comme LCB-2213 et LCB-2215 ont un pourcentage d'inhibition qui est le même à différentes concentrations, ce qui pourrait indiquer qu'ils sont cytotoxiques. En effet, un problème avec les tests d'adhésion cellule-cellule est que si l'antagoniste à tester est cytotoxique, il peut tuer les cellules endothéliales qui ne pourront plus médier l'adhésion des leucocytes. Ainsi, il est difficile de savoir si la diminution de fluorescence est associée à la cytotoxicité ou à l'adhésion de l'antagoniste. Afin de répondre à cette question, il est possible de se tourner vers des tests d'adhésion sélectine-cellule.

5.2.2. Adhésion sélectine-cellule

Les tests d'adhésion sélectine-cellule diffère du fait que ce sont les sélectines qui sont fixés dans les puits à la place des cellules endothéliales (Schéma 31B). Ceci permet d'étudier directement les interactions leucocytes/sélectines et antagoniste/sélectines. Les plaques des micropuits sont préenduites d'anticorps antihumains IgG (spécifique pour Fc), puis y sont ajoutés la sélectine E-Fc ou P-Fc pour les immobiliser. Puis, s'en suit les mêmes étapes que pour le test d'adhésion cellule-cellule, soit l'ajout de l'antagoniste et des leucocytes marqués, le lavage, la lyse et la détection.

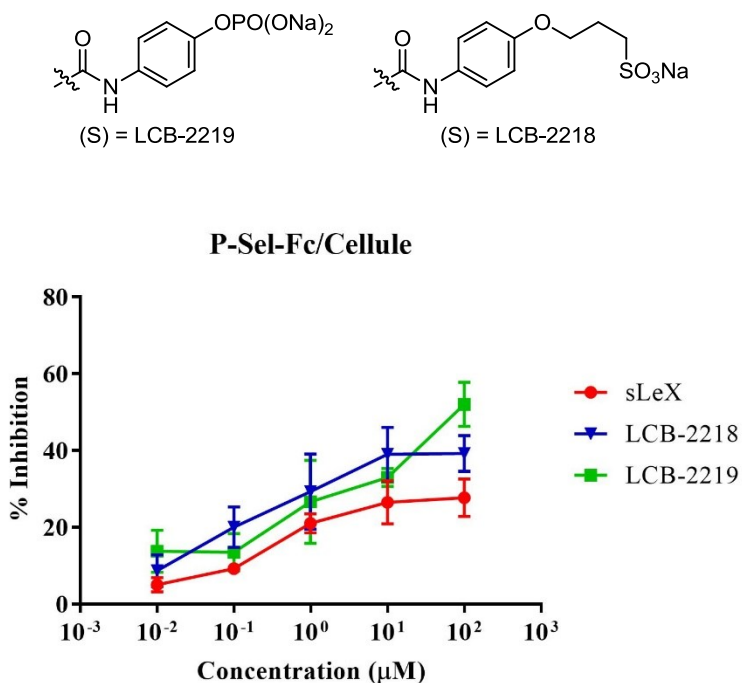


Figure 40. Adhésion sélectine P-Fc/cellule

Les résultats avec P-Sel-Fc ont été obtenus pour LCB-2218, LCB-2219 et sLe^x (Figure 40). Ceux-ci sont décevants puisque nos deux analogues les plus actifs en tests dynamiques

semblent avoir une affinité similaire à sLe^X. Afin de vérifier ces données, d'autres tests ont été faits en incorporant le stabilisateur StabilCoat® qui a pour effet de minimiser la fluorescence non spécifique (Figure 41). Le compte des leucocytes a été effectué à partir de photos obtenues après le lavage en utilisant un microscope AxioObserver D1 pour des essais à une concentration de 100 µM. Ces résultats démontrent l'efficacité de LCB-2218 et de LCB-2219 par rapport à sLe^X. Ainsi, les tests avec P-Sel-Fc à différentes concentrations seront refaits en utilisant le bloqueur ainsi que les tests avec E-Sel-Fc.

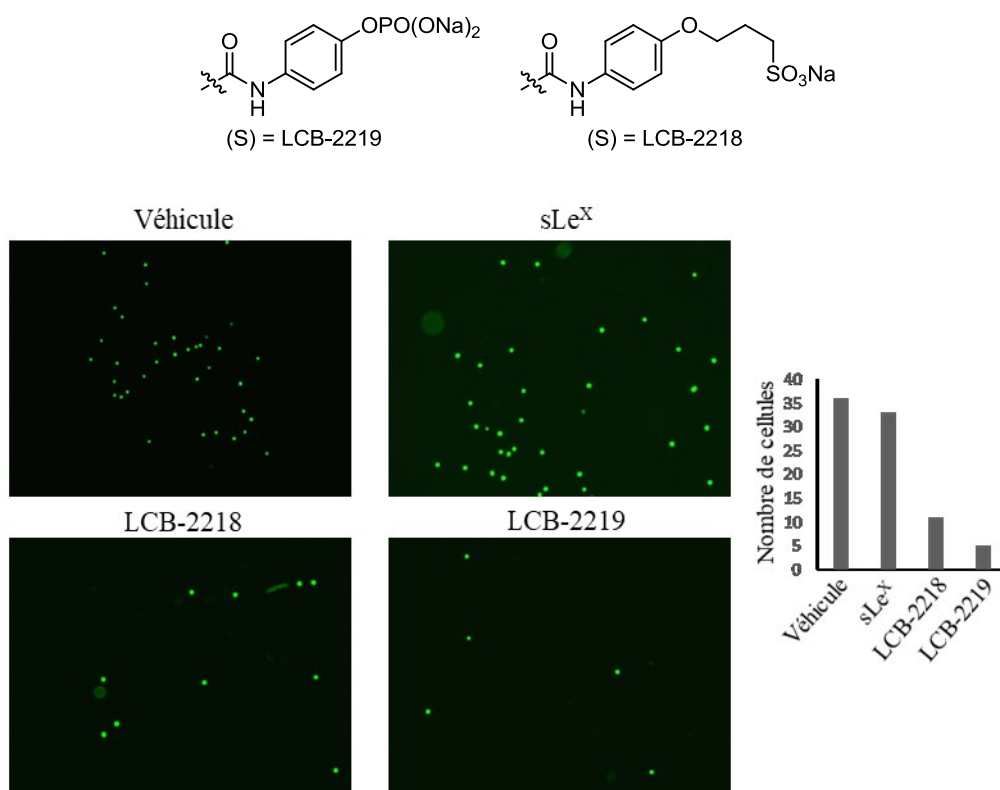


Figure 41. Photos de la fluorescence des leucocytes pour les tests P-Sel-Fc/cellule en utilisant un bloqueur

5.3. Modèle de lésion péritonéale sur les souris

L'injection de thioglycollate intrapéritonéale est une technique bien connue pour étudier la réponse inflammatoire aigue.^{169,170} En effet, le thioglycollate induit une péritonite, soit l'inflammation de la membrane qui tapisse la majorité des organes intra-abdominaux appelé le péritoine. Ce modèle *in vivo* sur les souris est utile, puisque la cavité péritonéale est facilement accessible pour la récolte des leucocytes.¹⁷⁰ Ainsi, il est possible de comparer le nombre de leucocytes qui migrent vers ces tissus lors de l'inflammation avec et sans antagonistes des sélectines. Rappelons-le, plus l'antagoniste possède une bonne affinité avec les sélectines, moins de leucocytes pourront ralentir sur la paroi endothéliale et moins pourront migrer vers le tissu inflammé. Un résumé du processus effectué pour ces tests est illustré au schéma 32. Premièrement, le glycollate est injecté de façon intrapéritonéale. Puis, après 10 minutes, l'antagoniste à tester est injecté par intraveineuse. Deux heures plus tard sont recueillies par un lavage les cellules présentes dans la cavité péritonéale. Le tri et le compte cellulaire sont effectués à l'aide de la cytométrie en flux qui permet de séparer la population des différents leucocytes. En premier est isolée la population des cellules qui comportent le marqueur PSGL-1. Puis, à partir de cette population, on isole la population de neutrophiles en sélectionnant les cellules qui contiennent les marqueurs CD11b et LY6G, mais qui ne contiennent pas LY6C (CD11b+, LY6G+, LY6C-).¹⁷¹ En effet, la présence des marqueurs CD11b et LY6G et l'absence des marqueurs LY6C est une caractéristique propre aux neutrophiles.

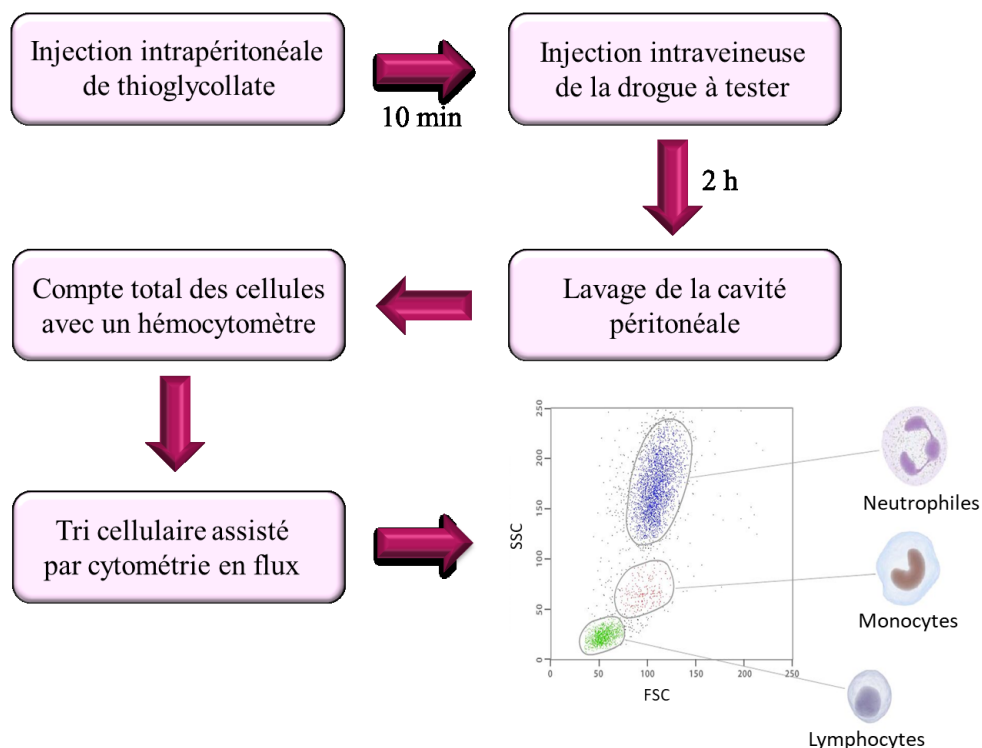


Schéma 32. Étapes clés de l'isolation des leucocytes du péritoine inflammé

Ces tests ont été effectués avec les deux meilleurs candidats, LCB-2218 et LCB 2219, ainsi qu'avec sLe^X à deux différentes doses (Figure 42). Lorsque seulement le thioglycollate est injecté, le nombre total de neutrophiles correspond à 100%. Lorsque LCB-2218 est injecté après le thioglycollate, on remarque une grande diminution dans le pourcentage de neutrophiles, soit une diminution d'environ 50% à une dose de 2.5 mmol/kg. Une diminution est aussi observable pour LCB-2219, mais elle est moins importante et similaire à sLe^X.

Les différents tests *in vitro* et *in vivo* pointent vers LCB-2218 et LCB-2219 comme étant les meilleurs candidats des 13 mimétiques synthétisés. Certains tests démontrent que LCB-2218 est le meilleur antagoniste, alors que d'autres sont en faveur de LCB-2219. Ainsi, davantage de tests seront effectués avec ces deux composés afin d'identifier avec certitude le meilleur antagoniste.

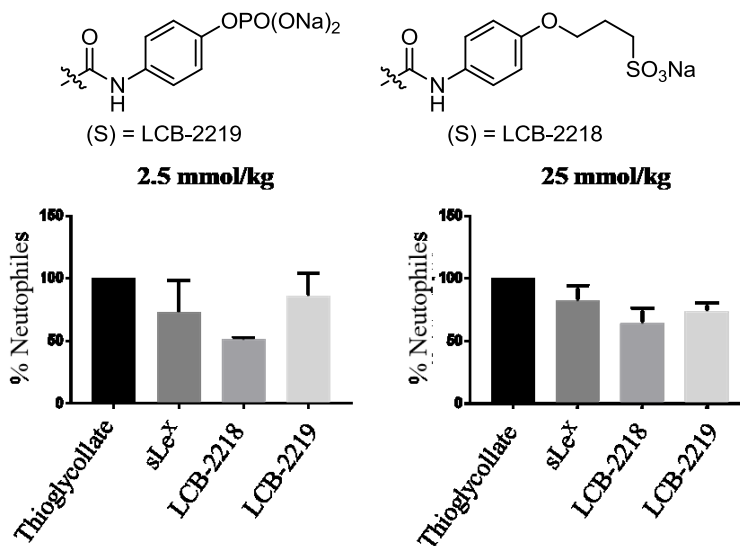


Figure 42. Résultats des lavages péritonéaux

5.4. Amarrage moléculaire

L'amarrage est une méthode de modélisation moléculaire qui permet de prédire l'orientation préférée d'une molécule lorsqu'elle est liée à une autre. Dans notre cas, des calculs d'amarrage pourraient nous fournir un aperçu du mode de liaison de nos mimétiques avec les sélectines. Des calculs d'amarrage ont été effectués par le Dr Michel Prévost en utilisant le programme DOCK 6.8 et la protéine 1G1S³³, soit le domaine lectine/EGF de la sélectine P complexé avec un fragment peptidique de PSGL-1. Après avoir retiré le peptide de PSGL-1, l'amarrage a été effectué avec les analogues LCB-2219 et LCB-2238 (Figure 43) afin d'identifier le site de liaison du pharmacophore anionique. Rappelons-le, ces deux analogues ne diffèrent que par l'inversion de la configuration de la chaîne qui comporte le pharmacophore anionique. L'analyse de ces deux molécules par des calculs d'amarrage nous permettra de vérifier si l'inversion de configuration a pour effet de changer le mode de liaison. Le design de notre deuxième génération de mimétiques du sLe^x avait pour but de bénéficier d'un second site

de liaison dont profitent les tyrosines sulfatées de PSGL-1. Ainsi, nous pensions que notre pharmacophore anionique interagirait soit avec His114 ou à Arg85 comme Tys7 ou Tys10 de PSGL-1 (Figure 8). Selon nos calculs, LCB-2219 pourrait plutôt profiter d'une interaction favorable avec Lys55, Asp83 et Trp60 alors que la longue chaîne légèrement hydrophobe qui relie le tartrate au pharmacophore anionique se situe favorablement dans une portion de charge électrostatique neutre. L'analogue ayant cette chaîne dans une configuration inversée, soit LCB-2238, va plutôt interagir avec les résidus Asn14 et Arg54. En effet, on observe que la chaîne s'oriente maintenant du côté opposé afin de maximiser les interactions favorables. L'hypothèse véhiculant que l'incorporation d'un pharmacophore anionique nous permettrait de se lier au site de liaison des tyrosines sulfate de PSGL-1 ne semble pas être soutenu par ces résultats. Il est possible que le caractère plutôt hydrophobe de la chaîne séparant le motif analogue au sLe^x et le pharmacophore anionique empêche son orientation vers le site de liaison voulu. Ainsi, il serait intéressant de développer une chaîne qui pourrait favoriser l'interaction avec la région électropositive entourant His114 et Arg85.

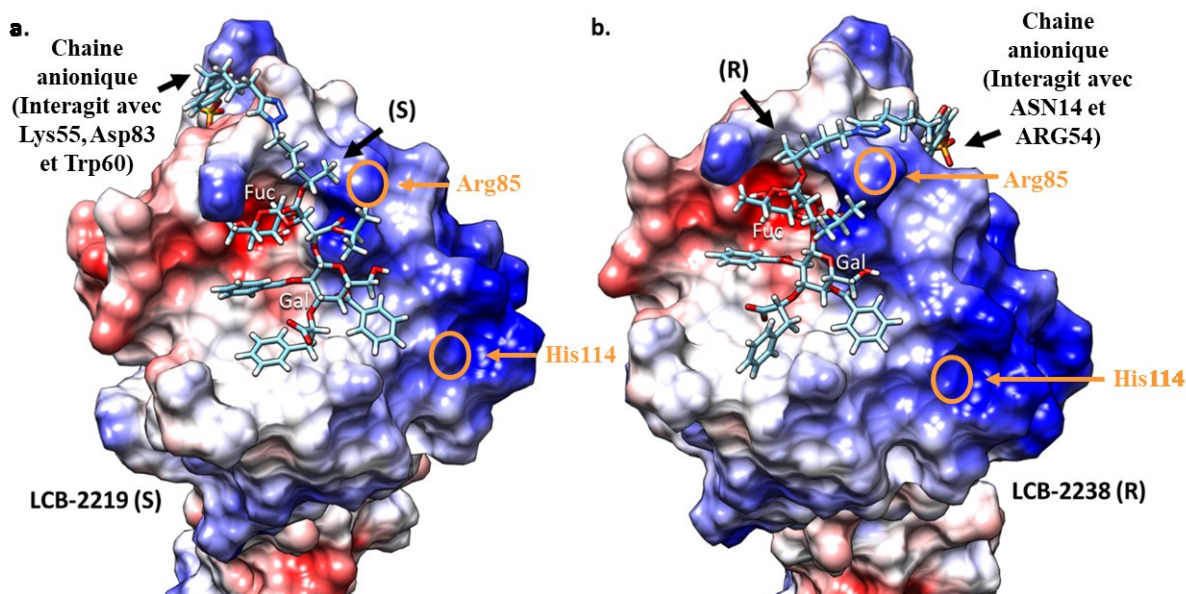


Figure 43. Résultats d'amarrage moléculaire de LCB-2219 et LCB-2238 avec P-LE

6. Synthèse des analogues amides du tartrate

6.1. Introduction

L'hydrolyse rapide des esters en conditions physiologiques est une problématique qui rend souvent incompatible l'utilisation de ces fonctions dans les médicaments.¹⁷² En effet, la plupart des drogues comportant des esters sont en fait des prodrogues, qui obtiennent leur activité biologique une fois que l'ester est clivé. Afin de remédier à la possibilité d'inactivation de nos molécules par l'hydrolyse des esters du tartrate, nous avons fait le design d'analogues qui comportent des fonctions amides moins facilement hydrolysables que les fonctions esters. Ce chapitre relate les efforts préliminaires mis dans la synthèse d'analogues amides.

6.2. Analogues de la première génération

Afin de vérifier l'activité d'un analogue amide par rapport à un analogue ester, il a été entrepris de synthétiser la version amide du composé le plus actif de la première génération d'analogues **6.1**. Cet analogue pourrait être obtenu suite à la glycosylation entre le composé **6.2** et la moitié galactose **4.21** dont la synthèse est décrite à la section 4.2. Quant à **6.2**, il serait obtenu à partir de **4.25** dont la synthèse a aussi été préalablement décrite à la section 4.3. le produit **6.2** pourrait aussi être obtenu par la glycosylation entre **6.3** et **4.24**. (Schéma 33).

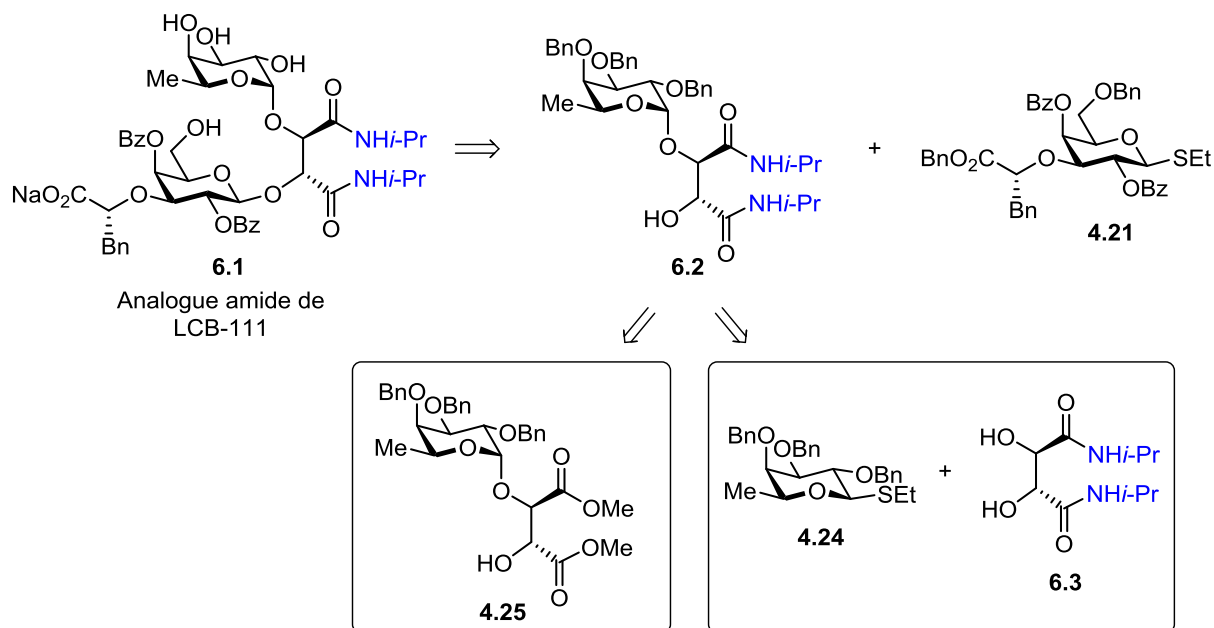


Schéma 33. Rétrosynthèse de l'analogue amide de la première génération

6.2.1. Synthèse de la moitié fucose-amide tartrate

En premier a été investiguée la synthèse du substrat **6.5** (Schéma 34). La saponification des esters de méthyle du produit commercial diméthyl 2,3-*O*-isopropylidène-L-tartrate mène au diacide **6.4**.¹⁷³ Ce dernier, lorsque soumis à deux conditions de couplages peptidiques usuelles, n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré **6.5**.

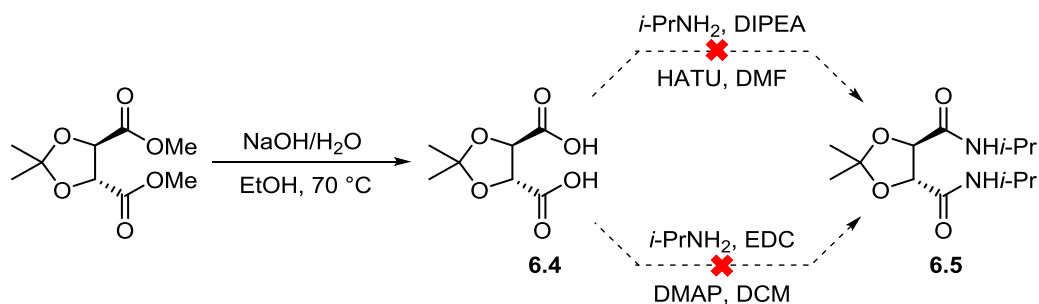
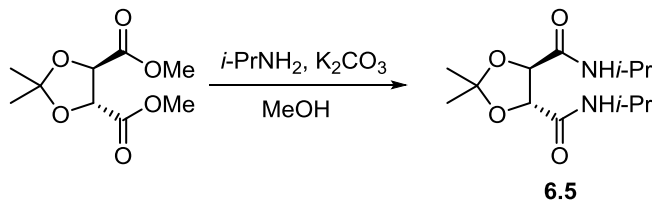


Schéma 34. Tentative d'obtenir **6.5** en passant par le diacide **6.4**

Toujours afin d'obtenir **6.5**, le diméthyl 2,3-*O*-isopropylidène-L-tartrate a été soumis à des conditions d'aminolyse du diester (Tableau 10). L'utilisation de 1.95 équivalent d'isopropylamine en présence d'une quantité catalytique de carbonate de potassium dans le méthanol à 70°C a mené à l'obtention du produit de départ non réagis ainsi que du monoamide dans un ratio de 2 : 1 après 16 heures (Entrée 1)¹⁷⁴. L'augmentation des équivalents de l'amine, de la température et du temps de réaction a finalement permis d'isoler **6.5** avec un rendement de 71% (Entrée 2).

Tableau 10. Conditions tentées pour l'obtention de **6.5**



Entrée	<i>i</i> -PrNH ₂ éq.	T°	Temps	Rendement
1	1.95	70°C	16 h	Produit de départ + monoamide
2	4.0	80°C	24 h	71%

S'en suit la déprotection du diol par le clivage acide de l'isopropylidène afin d'obtenir **6.3** dans un rendement de 86% (Schéma 35). Ce dernier est utilisé comme accepteur dans une réaction de glycosidation avec le résidu fucose. Les mêmes conditions que pour la glycosylation du diméthyle tartrate ont été tentées, mais le produit désiré **6.6** n'a été obtenu qu'en faible rendement (Tableau 11, Entrée 1).

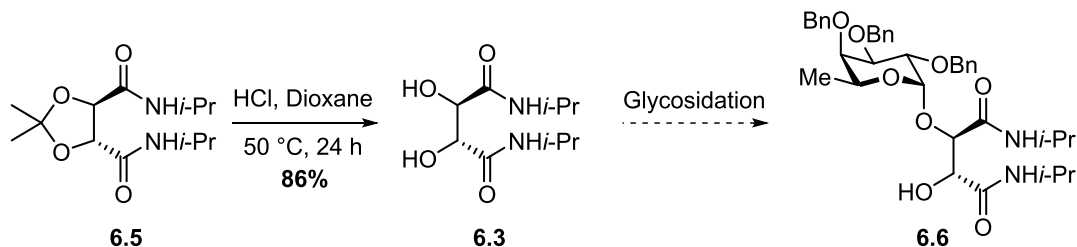
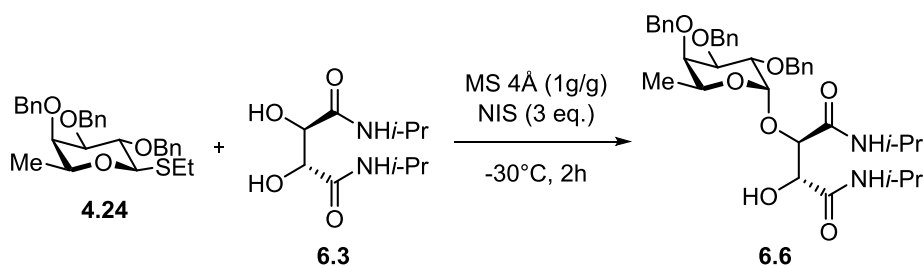


Schéma 35. Clivage acide de l'isopropylidène

Quelques paramètres ont été modifiés afin d'obtenir de meilleurs rendements (Tableau 11). Que ce soit l'augmentation de la concentration (Entrée 2), le changement de solvant (Entrée 3), l'échange de TfOH pour TMSOTf (Entrée 4) ou finalement l'augmentation des équivalents de tartrate (Entrée 5) n'ont pas permis d'augmenter le rendement à un niveau raisonnable.

Tableau 11. Tentatives de glycosylation de **6.6**.



Entrée	Réactifs	Solvant	Rendement
1	TfOH	CH ₂ Cl ₂ (0,05 M)	12 %
2	TfOH	CH ₂ Cl ₂ (0,3 M)	14 %
3	TfOH	Toluène (0,05 M)	<15 % ^a
4	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂ (0,05 M)	9 %
5	Tartrate (10 éq.) TfOH	Toluène (0,05 M)	<15 % ^a

^aRendements estimés par comparaison ¹H RMN

Les sous-produits majeurs qui ont été isolés lors de ces différents essais sont le produit d'élimination **6.7** et le produit de double glycosylation **6.8** (Figure 44). Ce dernier est peut-être favorisé, car le fucose-tartrate diamide est plus soluble que le tartrate non glycosylé. Cependant, le solvant est un facteur important qui influence la sélectivité α ou β . Ainsi, le choix de solvant pouvant permettre une meilleure solubilité tout en gardant la sélectivité pour l'anomère α est restreint.

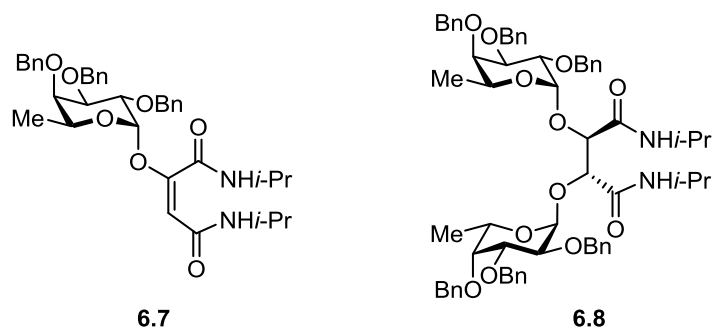


Figure 44. Sous-produits majoritaires lors de la glycosylation

Il a ensuite été entrepris de synthétiser **6.6** en partant du diméthyle ester tartrate déjà glycosylé **4.25** (Schéma 36). Les conditions d'aminolyse vues précédemment n'ont pas été concluantes pour effectuer la transformation de ce substrat puisqu'un mélange complexe de produits a été observé par ^1H RMN du brut réactionnel.

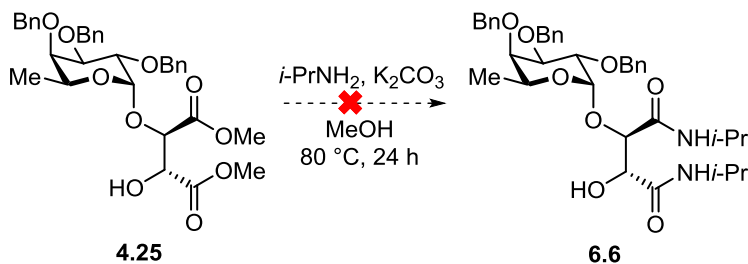


Schéma 36. L'aminolyse de **4.25** n'est pas concluante

Nous nous sommes donc tournés vers les conditions de couplage peptidique afin d'introduire la diisopropylamine sur le diacide **4.26** (Tableau 12). La procédure usuelle utilisant HATU comme agent de couplage en présence de diisopropyléthylamine servant de base a conduit à l'obtention d'un mélange de produits que ce soit à 80°C (Entrée 1) ou à température pièce (Entrée 2). Il en est de même lorsque les agents de couplages EDC et DMAP sont utilisés. Bien que des traces du produit désiré étaient présentes dans le brut réactionnel, un sous-produit

souvent observé est encore le produit d'élimination **6.7**. Finalement, une procédure modifiant l'ordre d'ajout des réactifs de l'entrée 2, la température ainsi qu'une diminution du nombre d'équivalents de base a mené à l'obtention du produit désiré (Entrée 4). Nous avons émis l'hypothèse qu'un trop grand excès de base favoriserait l'élimination qui produit **6.7**. Puisqu'il semblait que cette réaction était rapide et que la décomposition de la molécule entraînait la formation de plusieurs produits de décomposition, nous avons diminué la température à 0°C lors de l'ajout des réactifs. Afin d'éviter toute réaction de cyclisation intramoléculaire, l'isopropylamine a été ajouté avant l'activateur HATU. Tous ces changements ont permis d'obtenir **6.6** dans un rendement de 84%.

Tableau 12. Optimisation des conditions de couplage peptidique pour former **6.6**

4.26 $\xrightarrow{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ 6.6

Entrée	Conditions	T°	Rendement
1	1. DIPEA 2. HATU 3. i-PrNH ₂ (4 eq.)	80°C	Mélange complexe
2	1. DIPEA 2. HATU 3. i-PrNH ₂ (4 eq.)	tp	Mélange complexe
3	EDC, DMAP	tp	Mélange complexe
4	1. DIPEA 2. i-PrNH ₂ (2.2 eq.) 3. HATU	0°C à tp	84%

6.2.2. Glycosylation avec le résidu galactose

L'intermédiaire **6.6** est soumis aux conditions de glycosylation avec le résidu galactose **4.21** (Schéma 37), mais l'analyse du spectre de masse du brut réactionnel indique qu'on récupère seulement très peu du produit désiré **6.9**. Effectivement, on récupère surtout **6.6** non-réagi et le galactose **4.21** décomposé à son lactol correspondant. Les mêmes conditions sont essayées en utilisant un substrat modèle du galactose (**4.1**) et en augmentant la quantité de tamis moléculaires, mais le produit attendu **6.10** n'est toujours pas obtenu dans un rendement excédant les 10%. Le changement du solvant pour l'acétonitrile n'a pas permis d'améliorer le résultat. Ces résultats préliminaires ne sont que le début de l'investigation des analogues amides. D'autres efforts et d'autres stratégies seront mis en place afin d'obtenir une version amide de LCB-111.

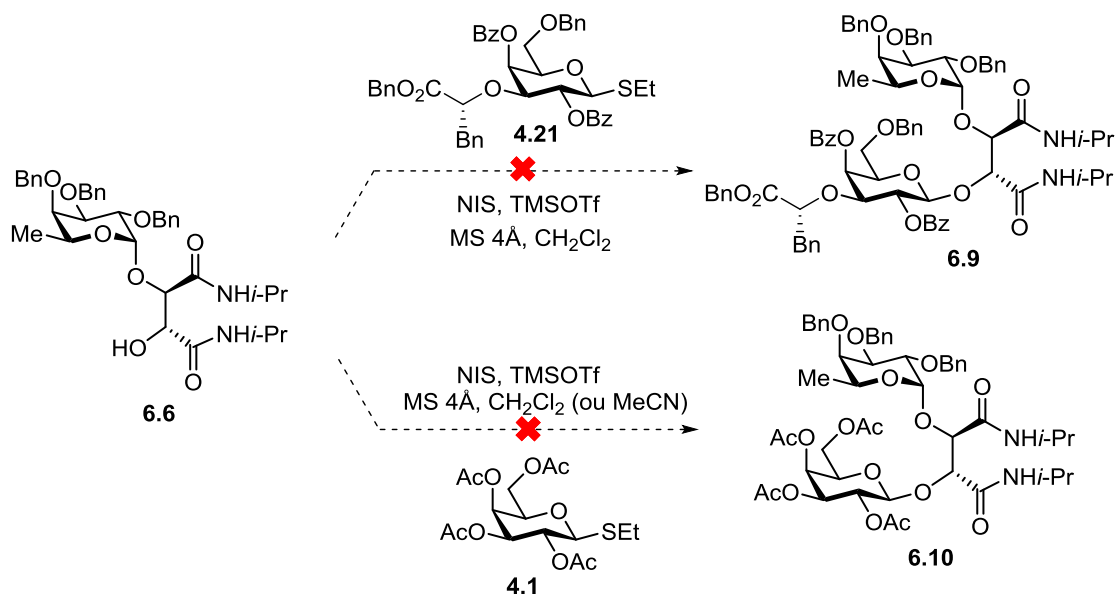


Schéma 37. Glycosylation du résidu fucose-tartrate diamide avec le résidu galactose

6.3. Analogues amides de la deuxième génération

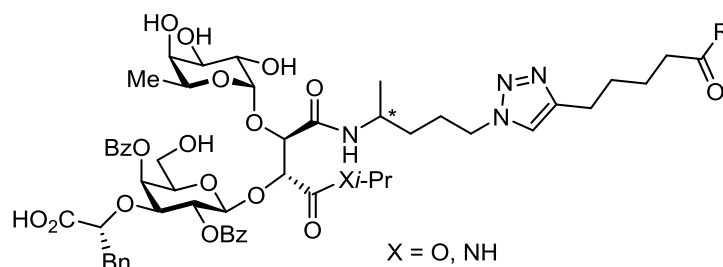


Figure 45. Analogues amides de la deuxième génération

Parallèlement à la synthèse d'analogues amide de la première génération, il a aussi été étudié la synthèse d'analogues amides de la deuxième génération de mimétiques du sLe^X rapportés au chapitre 4 (Figure 45). Pour ce faire, la synthèse du fragment de la chaîne latérale **4.38a** (S) et **4.38b** (R) (Section 4.3.3) doit être effectuée en remplaçant l'alcool par une amine. Il est possible de commencer la synthèse avec le produit de départ commercial Boc-L-alaninol ou Boc-D-alaninol (Schéma 38). L'oxydation de l'alcool à l'aldéhyde suivi d'une oléfination utilisant un réactif de Wittig stabilisée subséquente permet d'obtenir **6.11a** et **6.11b**. L'hydrogénation de ces derniers réduit la liaison double pour former **6.12a** et **6.12b** dont l'ester doit par la suite être réduit en alcool.

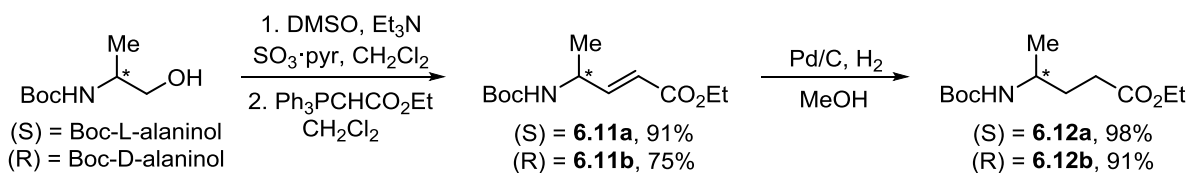
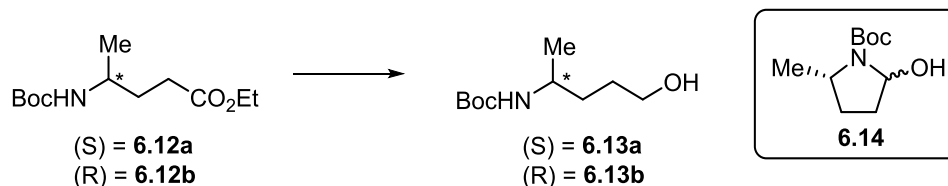


Schéma 38. Synthèse de l'intermédiaire **6.12**

Plusieurs conditions ont dû être tentées afin de réduire efficacement les esters **6.12a** et **6.12b** aux alcools **6.13a** et **6.13b** (Tableau 13), puisque l'utilisation du réducteur LiAlH_4 mène à un rendement de 23% (Entrée 1). Ce faible rendement est associé à la formation majoritaire du N,O-hémiacétal cyclique **6.14**. L'utilisation de DIBAL-H n'a pas permis de réduire l'ester (Entrée 2). La réduction d'une molécule similaire ayant pour seule différence l'ajout d'un carbone a été rapportée en utilisant LiBH_4 comme réducteur.¹⁷⁵ Cette procédure nécessite un temps de réaction de 20 heures à température pièce suivie de 24 heures en chauffant la réaction à 45°C. le composé **6.12b** a été soumis à ces conditions et nous avons obtenu une conversion complète et un brut réactionnel pur avec un rendement quantitatif (Entrée 3). Un essai en chauffant directement cette réaction a été tenté (Entrée 4), mais le rendement est moins haut en raison de la formation d'un produit secondaire non identifié. Finalement, il fut constaté que la réaction était complète après 20 heures à température pièce et un rendement de 86% est obtenu (Entrée 5).

Tableau 13. Optimisation de la réduction de **6.12**



Entrée	Substrat	Réactifs	Solvant	T°	Temps	Produit	Rdt
1	6.12a	LiAlH_4	THF	0°C	1 h	6.13a 6.14	23 % Majoritaire
2	6.12b	DIBAL-H	CH_2Cl_2	-40°C	2 h	6.12b	-
3	6.12b	LiBH_4	THF	tp 45°C	20 h 24 h	6.13b	Quantitatif
4	6.12b	LiBH_4	THF	45°C	8 h	6.13b	66 %
5	6.12b	LiBH_4	THF	tp	20 h	6.13b	86 %

Les alcools **6.13a** et **6.13b** sont transformés en mésylates et ces derniers sont déplacés par l'azoture de sodium pour générer les azotures **6.14a** et **6.14b** (Schéma 39) Nous avons ainsi obtenu les chaines **6.14a** et **6.14b** dont le groupement N-Boc pourra être clivé en mettant l'amine protégée en présence d'acide trifluoroacétique et on obtiendrait l'amine sous forme d'un sel de TFA.

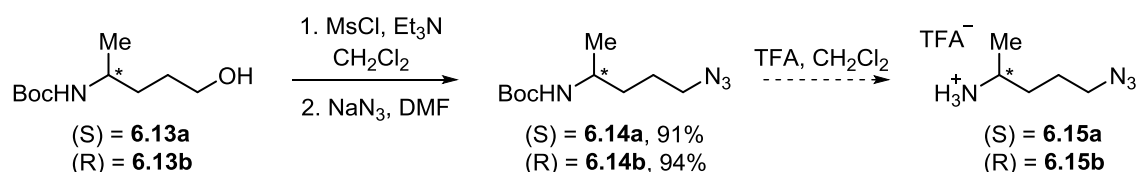


Schéma 39. Dernières étapes de la synthèse des fragments **6.15**.

Les composés **6.15a** et **6.15b** pourront être réagis avec l'acide du tartrate **4.27** afin de continuer la synthèse des analogues amides de la deuxième génération (Schéma 40). La suite de la synthèse n'a pas été entreprise pour l'instant en raison des problèmes de glycosylation du galactose sur le résidu fucose-tartrate des analogues amides de la première génération (Section 6.2.2). Il faudrait trouver des conditions permettant cette transformation avant de s'avancer davantage dans la synthèse de la deuxième génération.

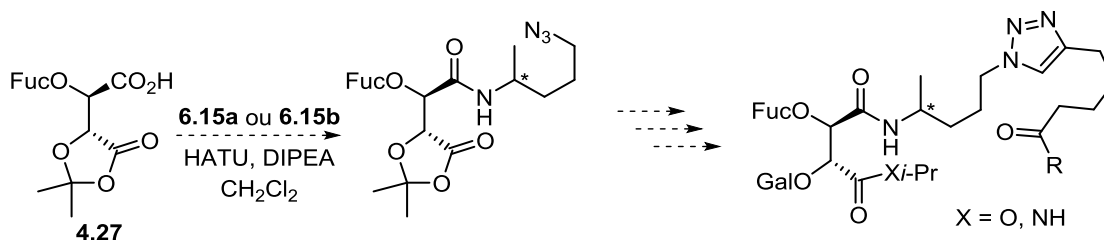


Schéma 40. Vers la formation des analogues amides de deuxième génération

6.4. Conclusion

La conception des homologues amides de nos mimétiques du sLe^X est basée sur l'idée que les amides sont plus stables *in vivo* par rapport aux esters. Ainsi, leur synthèse permettrait de vérifier s'ils sont autant actifs que leurs homologues esters *in vitro* et dans le cas échéant, éviter les problèmes d'hydrolyse pour les tests *in vivo*. Après quelques efforts, il a été possible d'effectuer la synthèse du résidu fucose-tartrate **6.6** afin d'obtenir un homologue amide de LCB-111. Toutefois, quelques essais préliminaires de glycosylation avec le résidu galactoside **4.21** n'ont pas permis d'obtenir le produit de glycosylation. La synthèse des fragments **6.14a** et **6.14b** a aussi été effectuée afin de produire les homologues amides de la deuxième génération de mimétiques présentés au chapitre 4. La synthèse de ceux-ci pourra être continuée lorsque des conditions de glycosylation appropriées seront trouvées.

Conclusion générale

Ce mémoire relate les travaux qui ont été effectués au niveau du design et de la synthèse d'une seconde génération de mimétiques du sLe^x comportant une unité tartrate qui intègre un nouveau pharmacophore anionique. En tout, 13 analogues ont été synthétisés avec succès par une synthèse convergente dont la séquence linéaire la plus longue est composée de 16 étapes et impliquant un total de 31 à 33 étapes.

Différents tests biologiques préliminaires ont été effectués avec ces analogues. Les tests *in vitro* d'adhésion cellulaire statique et dynamique de même que les tests *in vivo* ont permis d'identifier 2 candidats ayant une activité prometteuse, soit LCB-2218 et LCB-2219. D'autres tests seront requis afin de sélectionner l'analogue le plus actif, puisque certains tests sont en faveur de LCB-2218 et d'autres en faveur de LCB-2219. Somme toute, ces deux analogues sont plus efficaces que LCB-111, le meilleur candidat de la première génération de nos analogues.

La synthèse d'homologues comportant des fonctions amides à la place des esters du tartrate a aussi été investiguée. Des efforts préliminaires n'ont pas permis d'obtenir ces analogues amide, puisque la glycosydaton du résidu galactose avec le résidu fucose-tartrate diamide ne mène pas au produit de glycosydaton désiré. D'autres efforts devront être mis dans la synthèse de ces analogues amides, puisque ceux-ci profiteraient d'une meilleure stabilité face à l'hydrolyse qui se produirait en conditions physiologiques.

Les mimétiques que nous concevons ont pour but d'être utilisés par injection intraveineuse pour traiter des conditions aigues comme les crises vaso-occlusives chez les patients atteints d'anémie falciforme, ou lors de chirurgies d'ablation de tumeurs cancéreuses.

Partie expérimentale

Remarques générales

Toutes les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été effectuées sous atmosphère positive d'argon ou d'azote dans des montages préalablement séchés à l'étuve (60 °C) et flambés sous vide. Les réactifs disponibles commercialement ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le fluorure de césium a été activé en le chauffant à 120°C sous vide pendant 2 jours. La nomenclature des composés a été obtenue à partir du logiciel *ChemDraw Professional* (version 16.0). La partie expérimentale a été rédigée en anglais et est présentée à l'Annexe A, tel que permis par le *Guide de présentation des mémoires et des thèses de la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal*.

Solvants et chromatographie

Les solvants anhydres ont tous été séchés avec des tamis moléculaires de 4Å (1-2 mm) préalablement activés par chauffage à 180°C pendant 48h sous vide. Lorsque mentionné, les produits réactionnels ont été purifiés par chromatographie *flash* sur un gel de silice (porosité : 60 Å, taille : 40-75 µm) avec des solvants de grade HPLC à l'aide d'un appareil de type *Biotage Isolera One* (version 1.3.6). Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques F254 de gel de silice 60 sur aluminium (EMD Chemicals Inc.). Après élution, les produits ont d'abord été révélés par lampe UV, puis par une solution aqueuse de permanganate de potassium.

Instrumentation

Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) et carbone (RMN ^{13}C) ont été enregistrés à l'aide des appareils de type *Varian Unity INOVA* (500 MHz) en utilisant le pic résiduel de solvant non deutéré comme référence interne. Les déplacements chimiques des signaux sont rapportés en partie par million (δ , ppm), auxquels s'ajoutent les données de multiplicité, de constante de couplage en hertz (J , Hz) et de valeur d'intégration pour les spectres RMN ^1H . La multiplicité a été assignée selon le code suivant : s (singulet), apps (singulet apparent), d (doublet), appd (doublet apparent), dd (doublet de doublet), t (triplet), appt (triplet apparent), q (quadruplet), appq (quadruplet apparent) et m (multiplet).

Les spectres IR ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier (FTIR) de type *ABB Bomen* (série MB) à partir d'un film de produit purifié sur une pastille de NaCl. La position des pics en mode de transmittance est rapportée en cm^{-1} et le spectre a été corrigée en soustrayant le spectre de la pastille seule.

Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ ont été mesurés à température ambiante à l'aide d'un polarimètre *PerkinElmer 343* par la raie D du sodium (589 nm) avec une cellule de 1.0 mL et d'un parcours optique de 9.998 cm. La concentration (en g/100 mL) ainsi que le solvant utilisé sont également rapportés.

Les analyses de masse de basse et de haute résolution (HRMS) ont été réalisées par la *Plateforme de découvertes en protéomique* à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM). Les spectres ont été enregistrés sur un appareil *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Fisher) avec un mode d'ionisation par électronébulisateur (ESI) couplé à un piège à ions (IT). Les valeurs sont rapportées en utilisant le ratio m/z (masse/charge).

Bibliographie

1. Cicchitti, L.; Martelli, M.; Cerritelli, F. *PLoS One* **2015**, *10*, e0121327.
2. Yach, D.; Hawkes, C.; Gould, C. L.; Hofman, K. J. *JAMA*. **2004**, *291*, 2616.
3. Anderson, G.; Horvath, J. *Public Health Rep.* **2004**, *119*, 263.
4. Rubin, P.; Dube, L.; Braeckman, R.; Swanson, L.; Hansen, R.; Albert, D.; Carter, G. *Agents Actions Suppl.* **1991**, *35*, 103.
5. Walsh, G. M. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2008**, *13*, 643.
6. Robbins, S. L.; Kumar, V.; Cotran, R. S. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*; Saunders/Elsevier: Philadelphia, 2010.
7. Stafford-Smith, M. *Can. J. Anesth.* **2006**, *53*, 973.
8. Mantovani, A.; Dejana, E. In *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*; Elsevier: Oxford, 1998, p 802.
9. Finger, E. B.; Purl, K. D.; Alon, R.; Lawrence, M. B.; von Andrian, U. H.; Springer, T. A. *Nature* **1996**, *379*, 266.
10. Thomas, W. E.; Vogel, V.; Sokurenko, E. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 399.
11. Snook, J. H.; Guilford, W. H. *Cel. Mol. Bioeng.* **2010**, *3*, 128.
12. Pereverzev, Y. V.; Prezhdo, O. V.; Forero, M.; Sokurenko, E. V.; Thomas, W. E. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1446.
13. Preston, R. C.; Jakob, R. P.; Binder, F. P.; Sager, C. P.; Ernst, B.; Maier, T. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8*, 62.
14. Marshall, B. T.; Long, M.; Piper, J. W.; Yago, T.; McEver, R. P.; Zhu, C. *Nature* **2003**, *423*, 190.
15. Serhan, C. N.; Ward, P. A.; Gilroy, D. W. *Fundamentals of Inflammation*; Cambridge University Press: New York, 2010.
16. Leick, M.; Azcutia, V.; Newton, G.; Luscinskas, F. W. *Cell Tissue Res* **2014**, *355*, 647.
17. Ley, K.; Allietta, M.; Bullard, D. C.; Morgan, S. *Circ. Res.* **1998**, *83*, 287.
18. Kunkel, E. J.; Ley, K. *Circ. Res.* **1996**, *79*, 1196.

19. Stahl, W.; Sprengard, U.; Kretzschmar, G.; Kunz, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2096.
20. Ramphal, J. Y.; Zheng, Z.-L.; Perez, C.; Walker, L. E.; DeFrees, S. A.; Gaeta, F. C. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3459.
21. Brandley, B. K.; Kiso, M.; Abbas, S.; Nikrad, P.; Srivasatava, O.; Foxall, C.; Oda, Y.; Hasegawa, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 633.
22. Tyrrell, D.; James, P.; Rao, N.; Foxall, C.; Abbas, S.; Dasgupta, F.; Nashed, M.; Hasegawa, A.; Kiso, M.; Asa, D.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 10372.
23. Harris, R.; Kiddle, G. R.; Field, R. A.; Milton, M. J.; Ernst, B.; Magnani, J. L.; Homans, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2546.
24. Poppe, L.; Brown, G. S.; Philo, J. S.; Nikrad, P. V.; Shah, B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1727.
25. Scheffler, K.; Brisson, J.-R.; Weisemann, R.; Magnani, J. L.; Wong, W. T.; Ernst, B.; Peters, T. *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 423.
26. Peters, T.; Scheffler, K.; Ernst, B.; Katopodis, A.; Magnani, J. L.; Wang, W. T.; Weisemann, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1841.
27. Rinnbauer, M.; Ernst, B.; Wagner, B.; Magnani, J.; Benie, A. J.; Peters, T. *Glycobiology* **2003**, *13*, 435.
28. Erbe, D. V.; Wolitzky, B. A.; Presta, L. G.; Norton, C. R.; Ramos, R. J.; Burns, D. K.; Rumberger, J. M.; Rao, B. N.; Foxall, C.; Brandley, B. K. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 215.
29. Schwizer, D.; Patton, J. T.; Cutting, B.; Smieško, M.; Wagner, B.; Kato, A.; Weckerle, C.; Binder, F. P. C.; Rabbani, S.; Schwardt, O.; Magnani, J. L.; Ernst, B. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1342.
30. Ishida, T. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3950.
31. Binder, F. P.; Lemme, K.; Preston, R. C.; Ernst, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 7327.
32. Graves, B. J.; Crowther, R. L.; Chandran, C.; Rumberger, J. M.; Li, S.; Huang, K. S.; Presky, D. H.; Familletti, P. C.; Wolitzky, B. A.; Burns, D. K. *Nature* **1994**, *367*, 532.
33. Somers, W. S.; Tang, J.; Shaw, G. D.; Camphausen, R. T. *Cell* **2000**, *103*, 467.
34. Hidalgo, A.; Peired, A. J.; Wild, M.; Vestweber, D.; Frenette, P. S. *Immunity* **2007**, *26*, 477.

35. Li, F.; Wilkins, P. P.; Crawley, S.; Weinstein, J.; Cummings, R. D.; McEver, R. P. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3255.
36. Wilkins, P. P.; Moore, K. L.; McEver, R. P.; Cummings, R. D. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22677.
37. Carvalho, S.; Catarino, T. A.; Dias, A. M.; Kato, M.; Almeida, A.; Hessling, B.; Figueiredo, J.; Gärtner, F.; Sanches, J. M.; Ruppert, T.; Miyoshi, E.; Pierce, M.; Carneiro, F.; Kolarich, D.; Seruca, R.; Yamaguchi, Y.; Taniguchi, N.; Reis, C. A.; Pinho, S. S. *Oncogene* **2015**, *35*, 1619.
38. Stowell, S. R.; Ju, T.; Cummings, R. D. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2015**, *10*, 473.
39. Harduin-Lepers, A.; Krzewinski-Recchi, M. A.; Colomb, F.; Foulquier, F.; Groux-Degroote, S.; Delannoy, P. *Front. Biosci. (Elite Ed)* **2012**, *4*, 499.
40. Büll, C.; Boltje, T. J.; van Dinther, E. A. W.; Peters, T.; de Graaf, A. M. A.; Leusen, J. H. W.; Kreutz, M.; Figdor, C. G.; den Brok, M. H.; Adema, G. J. *ACS Nano* **2015**, *9*, 733.
41. Läubli, H.; Borsig, L. *Semin. Cancer Biol.* **2010**, *20*, 169.
42. Heidemann, F.; Schildt, A.; Schmid, K.; Bruns, O. T.; Riecken, K.; Jung, C.; Ittrich, H.; Wicklein, D.; Reimer, R.; Fehse, B.; Heeren, J.; Lüers, G.; Schumacher, U.; Heine, M. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e92327.
43. Geng, Y.; Yeh, K.; Takatani, T.; King, M. *Front. Oncol.* **2012**, *2*.
44. Natoni, A.; Macauley, M. S.; O'Dwyer, M. E. *Front. Oncol.* **2016**, *6*.
45. Gutsaeva, D. R.; Parkerson, J. B.; Yerigenahally, S. D.; Kurz, J. C.; Schaub, R. G.; Ikuta, T.; Head, C. A. *Blood* **2011**, *117*, 727.
46. Turhan, A.; Weiss, L. A.; Mohandas, N.; Collier, B. S.; Frenette, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 3047.
47. Manwani, D.; Frenette, P. S. *Blood* **2013**, *122*, 3892.
48. Hidalgo, A.; Chang, J.; Jang, J. E.; Peired, A. J.; Chiang, E. Y.; Frenette, P. S. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 384.
49. Bedard, P. W.; Kaila, N. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, 781.
50. Kaila, N.; Thomas, B. E. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 305.
51. De Luca, M.; Dunlop, L. C.; Andrews, R. K.; Flannery, J. V.; Ettling, R.; Cumming, D. A.; Veldman, G. M.; Berndt, M. C. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26734.

52. Daun, J.; Davis, H. A.; Gusovsky, F.; Hishinuma, I.; Jiang, Y.; Kaneko, T.; Kikuchi, K.; Kobayashi, S.; Lescarbeau, A.; Li, X. L. WO 057696; 2003.
53. Husband, A.; Kelly, G. US 0119301; 2005.
54. Walker, T.; Wendel, H.-P. WO 077112; 2006.
55. Stevenson, J. L.; Varki, A.; Borsig, L. *Thromb. Res.* **2007**, *120 Suppl 2*, S107.
56. Hostettler, N.; Naggi, A.; Torri, G.; Ishai-Michaeli, R.; Casu, B.; Vlodavsky, I.; Borsig, L. *FASEB J.* **2007**, *21*, 3562.
57. Wei, M.; Gao, Y.; Tian, M.; Li, N.; Hao, S.; Zeng, X. *Canc. Lett.* **2005**, *229*, 123.
58. Beeh, K. M.; Beier, J.; Meyer, M.; Buhl, R.; Zahlten, R.; Wolff, G. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2006**, *19*, 233.
59. Friedrich, M.; Bock, D.; Philipp, S.; Ludwig, N.; Sabat, R.; Wolk, K.; Schroeter-Maas, S.; Aydt, E.; Kang, S.; Dam, T. N.; Zahlten, R.; Sterry, W.; Wolff, G. *Arch. Dermatol. Res.* **2006**, *297*, 345.
60. Krishnamurthy, V. R.; Sardar, M. Y.; Ying, Y.; Song, X.; Haller, C.; Dai, E.; Wang, X.; Hanjaya-Putra, D.; Sun, L.; Morikis, V.; Simon, S. I.; Woods, R. J.; Cummings, R. D.; Chaikof, E. L. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6387.
61. Telen, M. J.; Wun, T.; McCavit, T. L.; De Castro, L. M.; Krishnamurti, L.; Lanzkron, S.; Hsu, L. L.; Smith, W. R.; Rhee, S.; Magnani, J. L.; Thackray, H. *Blood* **2015**, *125*, 2656.
62. Piel, J. *Natural Products via Enzymatic Reactions*; Springer: Bonn, 2010.
63. Calosso, M.; Tambutet, G.; Charpentier, D.; St-Pierre, G.; Vaillancourt, M.; Bencheqroun, M.; Gratton, J.-P.; Prévost, M.; Guindon, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1054.
64. Sinnott, M. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and Mechanism*; RSC Publishing: Cambridge, 2007.
65. Bočkov, A. F.; Zaikov, G. E.; Afanas'ev, V. A. *Carbohydrates*; Taylor & Francis: Utrecht, 1991.
66. Stick, R. V.; Williams, S. *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*; Elsevier Science: Oxford, 2010.
67. Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637.
68. Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.

69. Edward, J. T. *Chem. Ind. (London)* **1955**, 1102.
70. Lemieux, R. U. *Abst. Am. Chem. Soc.* **1958**, 133, 31N.
71. Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 497.
72. Huang, M.; Garrett, G. E.; Birlirakis, N.; Bohé, L.; Pratt, D. A.; Crich, D. *Nat. Chem.* **2012**, 4, 663.
73. Crich, D. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1144.
74. Guo, J.; Ye, X.-S. *Molecules* **2010**, 15, 7235.
75. Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 957.
76. Helferich, B.; Gootz, R. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A/B* **1929**, 62, 2788.
77. Teruaki, M.; Yoshiyuki, M.; Shin-ichiro, S. *Chem. Lett.* **1981**, 10, 431.
78. Schmidt, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
79. Yu, B.; Sun, J. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4668.
80. Ferrier, R. J.; Hay, R. W.; Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, 55.
81. Codee, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 769.
82. Lian, G.; Zhang, X.; Yu, B. *Carbohydr. Res.* **2015**, 403, 13.
83. Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1331.
84. Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4313.
85. Fügedi, P.; Garegg, P. J. *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, C9.
86. Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; McDevitt, R. E.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 270.
87. Ranade, S. C.; Demchenko, A. V. *J. Carbohydr. Chem.* **2013**, 32, 1.
88. Nelson, R. M.; Dolich, S.; Aruffo, A.; Cecconi, O.; Bevilacqua, M. P. *J. Clin. Invest.* **1993**, 91, 1157.
89. Otsubo, N.; Ishida, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *Carbohydr. Res.* **1998**, 306, 517.

90. Manning, D. D.; Bertozzi, C. R.; Pohl, N. L.; Rosen, S. D.; Kiessling, L. L. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6254.
91. Ohmoto, H.; Nakamura, K.; Inoue, T.; Kondo, N.; Inoue, Y.; Yoshino, K.; Kondo, H.; Ishida, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1339.
92. Yuen, C. T.; Lawson, A. M.; Chai, W.; Larkin, M.; Stoll, M. S.; Stuart, A. C.; Sullivan, F. X.; Ahern, T. J.; Feizi, T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9126.
93. Hiramatsu, Y.; Tsujishita, H.; Kondo, H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4547.
94. DeFrees, S. A.; Gaeta, F. C. A.; Lin, Y. C.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7549.
95. Kaila, N.; Thomas IV, B. E. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 566.
96. Bänteli, R.; Ernst, B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4059.
97. Kolb, H. C.; Ernst, B. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1571.
98. Bamford, M. J.; Bird, M.; Gore, P. M.; Holmes, D. S.; Priest, R.; Prodger, J. C.; Saez, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 239.
99. Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833.
100. Ragan, J. A.; Cooper, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2563.
101. Guindon, Y.; Ogilvie, W. W.; Bordeleau, J.; Cui, W. L.; Durkin, K.; Gorys, V.; Juteau, H.; Lemieux, R.; Liotta, D.; Simoneau, B.; Yoakim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 428.
102. Drouin, M.; Michel, A. G.; Guindon, Y.; Ogilvie, W. *Acta Crystallogr., Sect. C* **1993**, *49*, 75.
103. Thoma, G.; Bänteli, R.; Jahnke, W.; Magnani, J. L.; Patton, J. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3644.
104. Calosso, M.; Charpentier, D.; Vaillancourt, M.; Bencheqroun, M.; St-Pierre, G.; Wilkes, B. C.; Guindon, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1045.
105. Calosso, M. Synthèse d'une librairie d'analogues monomériques et dimériques du sLex. M. Sc. Dissertation, Université de Montréal, 2009.
106. Pouyani, T.; Seed, B. *Cell* **1995**, *83*, 333.
107. Kováč, P. *Synthetic Oligosaccharides: Indispensable Probes for the Life Sciences*; American Chemical Society: Johnson City, 1994.

108. Wagner, D.; Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 24.
109. David, S.; Hanessian, S. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643.
110. David, S.; Thiéffry, A. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2647.
111. Grindley, T. B.; Kong, X. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5231.
112. Hanessian, S. *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Taylor & Francis: New York, 1997.
113. Lu, S. Computational Models of Organotin-Mediated Alkylation of Diols. M. Sc. Dissertation, Dalhousie University, 2013.
114. Danishefsky, S.; Hungate, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2486.
115. Nobuo, N.; Masaji, O. *Chem. Lett.* **1987**, *16*, 141.
116. David, S.; Thieffry, A.; Veyrieres, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1981**, 1796.
117. Carmen Cruzado, M.; Martin-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 193.
118. Dong, H.; Zhou, Y.; Pan, X.; Cui, F.; Liu, W.; Liu, J.; Ramström, O. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1457.
119. Ernst, B.; Wagner, B.; Baisch, G.; Katopodis, A.; Winkler, T.; Öhrlein, R. *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 892.
120. Magnani, J. L.; Peterson, J. M.; Mirko, Z.; Martin, S.; Beat, E. US 333043; 2016.
121. Magnani, J. L.; Patton, J. T.; Smith, T. A. G. US 8518896B2; 2008.
122. Kocienski, P. J. *Protecting Groups*; Thieme: New York, 2005.
123. Ágoston, K.; Watt, G. M.; Fügedi, P. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5010.
124. Wang, H.; She, J.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5774.
125. Despras, G.; Robert, R.; Sendid, B.; Machez, E.; Poulain, D.; Mallet, J.-M. *Biorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1817.
126. Li, Z.; Gildersleeve, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11612.
127. Cassel, S.; Debaig, C.; Benvegna, T.; Chaimbault, P.; Lafosse, M.; Plusquellec, D.; Rollin, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 875.
128. Dudkin, V. Y.; Miller, J. S.; Dudkina, A. S.; Antczak, C.; Scheinberg, D. A.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13598.

129. Simas, A. B. C.; da Silva, A. A. T.; dos Santos Filho, T. J.; Barroso, P. T. W. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2744.
130. Doukas, H. M.; Fontaine, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5917.
131. Eliel, E.; Rerick, M. *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 1088.
132. Eliel, E. L.; Badding, V. G.; Rerick, M. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2371.
133. Bhattacharjee, S. S.; Gorin, P. A. J. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 1195.
134. Lipták, A.; Jodál, I.; Nánási, P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *44*, 1.
135. Lipták, A.; Imre, J.; Harangi, J.; Nánási, P.; Neszmélyi, A. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3721.
136. Garegg, P. J. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 845.
137. Ek, M.; Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Oscarson, S. *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2*, 305.
138. Daragics, K.; Fügedi, P. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2914.
139. Garegg, P. J.; Hultberg, H. *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C10.
140. J. Garegg, P.; Hultberg, H.; Wallin, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, *108*, 97.
141. DeNinno, M. P.; Etienne, J. B.; Duplantier, K. C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 669.
142. Debenham, S. D.; Toone, E. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 385.
143. Sakagami, M.; Hamana, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5547.
144. Ohlin, M.; Johnsson, R.; Ellervik, U. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1358.
145. Pohl, N. L.; Kiessling, L. L. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6985.
146. Panchadhayee, R.; Misra, A. K. *Synlett* **2010**, *2010*, 1193.
147. Swinnen, D.; Bombrun, A.; Gonzalez, J.; Crosignani, S.; Gerber, P.; Jorand-Lebrun, C. WO 010751; 2006.
148. France, B.; Bruno, V.; Nicolas, I. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 158.
149. Padwa, A. *1,3-dipolar cycloaddition chemistry*; Wiley: New York, 1984.
150. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
151. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.

152. Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1302.
153. Fokin, V. V. In *Organic Chemistry – Breakthroughs and Perspectives*; Ding, K., Dai, L.-X., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2012, p 247.
154. Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9152.
155. Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2210.
156. Liang, L.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 2933.
157. Ahlquist, M.; Fokin, V. V. *Organometallics* **2007**, 26, 4389.
158. Straub, B. F. *Chem. Commun.* **2007**, 3868.
159. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, 340, 457.
160. Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2715.
161. Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952.
162. Shao, C.; Wang, X.; Zhang, Q.; Luo, S.; Zhao, J.; Hu, Y. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 6832.
163. Lam, S. N.; Acharya, P.; Wyatt, R.; Kwong, P. D.; Bewley, C. A. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 10113.
164. Brunner, E. J. *J. Chem. Eng. Data* **1985**, 30, 269.
165. Tang, Y.; Zeng, X.; Liang, J. J. *J. Chem. Educ.* **2010**, 87, 742.
166. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sens. Actuators, B* **1999**, 54, 3.
167. Pattnaik, P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, 126, 79.
168. Stocker, C. J.; Sugars, K. L.; Harari, O. A.; Landis, R. C.; Morley, B. J.; Haskard, D. O. *J. Immunol.* **2000**, 164, 3309.
169. Greenlee-Wacker, M. C.; Briseño, C.; Galvan, M.; Moriel, G.; Velázquez, P.; Bohlson, S. S. *J. Immunol.* **2011**, 187, 3353.
170. Fortier, A. H.; Falk, L. A. *Current Protocols in Immunology* **1994**, 11, 14.1.1.
171. Swamydas, M.; Luo, Y.; Dorf, M. E.; Lionakis, M. S. *Current Protocols in Immunology* **2015**, 110, 3.20.1.
172. Testa, B.; Mayer, J. *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*; John Wiley & Sons: Zürich, 2003.

173. Dindaroğlu, M.; Dinçer, S. A.; Schmalz, H. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 4315.
174. Darko, A. K.; Curran, F. C.; Copin, C.; McElwee-White, L. *Tetrahedron* **2011**, 67, 3976.
175. Sun, C.; Ewing, W. R.; Bolton, S. A.; Gu, Z.; Huang, Y.; Murugesan, N.; Zhu, Y. WO 125662; 2012.

Annexe A : Partie expérimentale et caractérisation

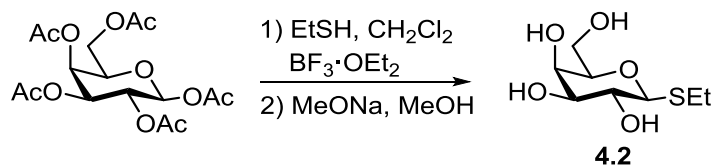
Section expérimentale du chapitre 4

Procédures générales

General procedure A – Coupling with different nucleophile. A solution of the corresponding carboxylic acid (1.0 eq.) in DMF (0.1 M) at room temperature was treated with diisopropylethylamine (3.0 eq.). After stirring 10 minutes, HATU (1.3 eq.) was added. After another 10 minutes, the corresponding nucleophile (2.0 eq.) was added and this was stirred for 24 hours at room temperature (or higher temperature when specified) before it was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH and Dowex[®] Marathon[™] C sodium form resin was added. This was stirred for 1 hour before filtration and concentration *in vacuo*.

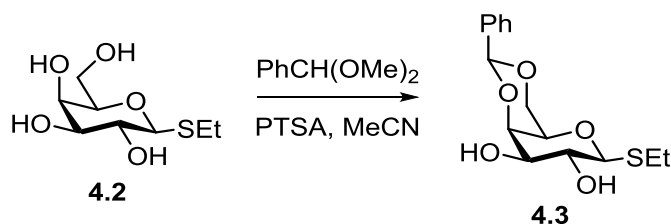
General procedure B – Final deprotection of analogues. To a solution of the corresponding analogue (1.0 eq.) in THF (0.012 M) was added 15 % wt. Pd(OH)₂ (1.45 eq.). The inert atmosphere was replaced by a positive pressure of H₂, purging 3 times with vacuum. The reaction mixture was stirred at room temperature 48 hours under 1 atm of H₂. The resulting mixture was filtered on Celite[®], washed with MeOH and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH and Dowex[®] Marathon[™] C sodium form resin was added. The resulting mixture was stirred for 1 hour before filtration and concentration *in vacuo*.

(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(Ethylthio)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (4.2)



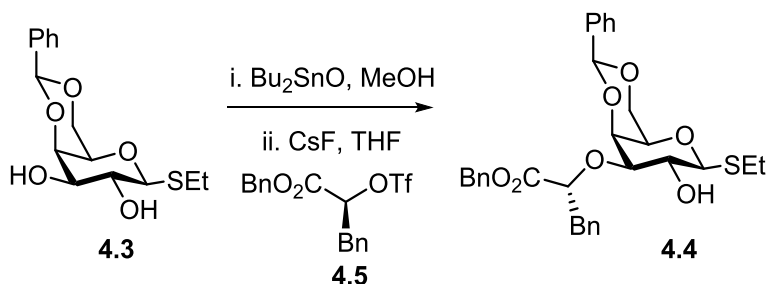
Synthesis of compound **4.2** have already been reported and characterized by our laboratory.¹

(2*S*,4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6-(Ethylthio)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-*d*][1,3]dioxine-7,8-diol (4.3)



To a solution of the β -D-Thioethangalactoside **4.2** (28.0 g, 125 mmol, 1.00 eq.) in acetonitrile (380 mL, 0.300 M) was added PTSA (1.2 g, 6.2 mmol, 0.050 eq.) and benzaldehyde dimethyl acetal (22.5 mL, 150 mmol, 1.20 eq.). The reaction mixture was stirred 4 hours and neutralized with Et₃N. EtOAc (250 mL) and water (300 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 250 mL). The combined organic layers dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was precipitated in Et₂O and filtrated to provide **4.3** (34 g, 87 %) as a white solid. **4.3** have already been characterized by our laboratory and the NMR spectroscopic data correlates with what we previously reported.¹

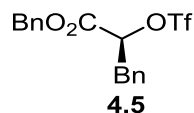
Benzyl **(*R*)-2-(((2*S*,4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(Ethylthio)-7-hydroxy-2-phenylhexahydropyrano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-yl)oxy)-3-phenylpropanoate (4.4)**



A suspension of **4.3** (2.1 g, 6.7 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (96 mL, 0.070 M) and Bu₂SnO (2.2 g, 8.7 mmol, 1.3 eq.) was heated under reflux for 2 hours. The resulting mixture was co-evaporated with toluene *in vacuo*. The residue was dissolved in THF (96 mL, 0.070 M) then activated CsF (3.1 g, 20 mmol, 3.0 eq.) and **4.5** (7.8 g, 20 mmol, 3.0 eq.) were added successively. The reaction was stirred 2 hours and water (100 mL) and EtOAc (100 mL) were added. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 50:50) provided **4.4** (2.9 g, 79 %) as a white foam. **4.4** have already been

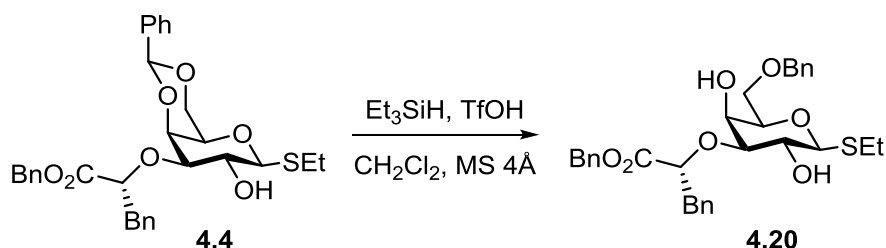
characterized by our laboratory and the NMR spectroscopic data correlates with what we previously reported.¹

Benzyl (S)-3-phenyl-2-(((trifluoromethyl)sulfonyl)oxy)propanoate (4.5)



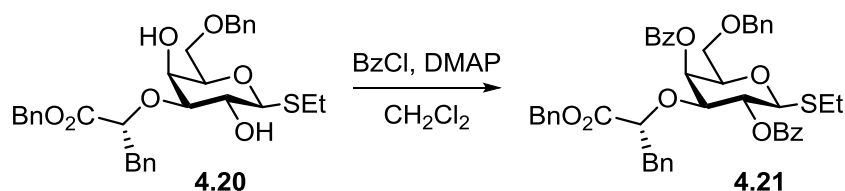
Synthesis of compound **4.5** have already been reported and characterized by our laboratory.²

Benzyl (R)-2-(((2R,3S,4S,5R,6S)-2-((benzyloxy)methyl)-6-(ethylthio)-3,5-dihydroxy tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-3-phenylpropanoate (4.20)



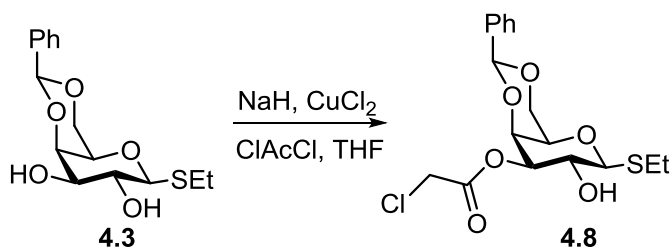
To a solution of **4.4** (1.3 g, 2.4 mmol, 1.0 eq.) with 4Å molecular sieves (1.0 g/mmol) in CH₂Cl₂ (24 mL, 0.10 M) cooled at -78°C was added Et₃SiH (0.60 mL, 3.8 mmol, 1.6 eq.) followed by TfOH (0.31 mL, 3.5 mmol, 1.5 eq.). After 4 hours, the mixture was filtrated to remove the molecular sieves and the organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 65:35) provided **4.20** (0.66 g, 50 %) as a colorless oil. **R_f** = 0.49 (hexanes/EtOAc, 50:50); **[α]_D²⁵** +10 (*c* 1.2, CH₂Cl₂); **Formula** C₃₁H₃₆O₇S; **MW** 552.6820 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3553, 3446, 3027, 2866, 1723, 1449, 1212, 1106 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.26 (m, 15H), 5.25 (s, 2H), 4.52 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.27 – 4.22 (m, 2H), 3.81 – 3.75 (m, 1H), 3.60 – 3.58 (m, 2H), 3.47 – 3.43 (m, 2H), 3.22 (dd, *J* = 13.9, 3.3 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 13.8, 10.7 Hz, 1H), 2.79 – 2.66 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 138.1, 137.1, 134.9, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 128.4, 127.7, 127.7, 127.4, 85.4, 84.2, 78.5, 76.9, 73.5, 68.8, 68.1, 67.7, 65.6, 39.2, 23.9, 15.1 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₃₁H₃₆NaO₇S 575.2074; Found 575.2071 (-0.49 ppm).

(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-4-(((*R*)-1-(Benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-2-((benzyl oxy)methyl)-6-(ethylthio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,5-diyl dibenzoate (4.21)



To a solution of the alcohol **4.20** (2.4 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (44 mL, 0.10 M) cooled to 0°C was added DMAP (3.2 g, 26 mmol, 6.0 eq.) and BzCl (1.2 mL, 11 mmol, 2.4 eq.). The reaction mixture was stirred over 16 hours and concentrated. Purification by flash chromatography (hexanes:EtOAc, 75:25) provided **4.21** (2.7 g, 80 %) as a colorless oil. **4.21** have already been characterized by our laboratory and the NMR spectroscopic data correlates with what we previously reported.¹

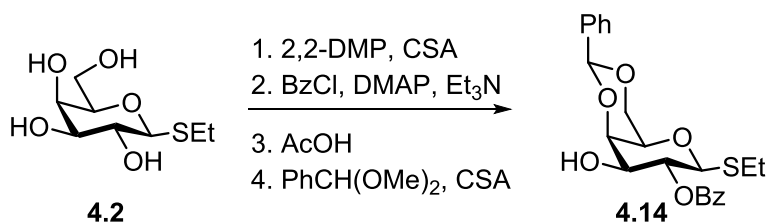
(2*S*,4*aR*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aS*)-6-(Ethylthio)-7-hydroxy-2-phenylhexahydropyrano[3,2-*d*][1,3]dioxin-8-yl 2-chloroacetate (4.8)



To a solution of **4.3** (0.10 g, 0.32 mmol, 1.0 eq.) in THF (3.2 mL, 0.10 M) was added NaH (25 mg, 0.63 mmol, 2.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour then CuCl₂ (43 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq.) was added. After 30 minutes, the reaction mixture was cooled to -15°C then chloroacetyl chloride (36 µL, 0.45 mmol, 1.4 eq.) was added over 20 minutes. The reaction mixture was stirred for 1 hour at -15°C before EtOAc (5 mL) was added and the organic layer was washed successively with a 2.5% NH₃ solution (10 mL), a 2 M HCl solution (10 mL) and H₂O (10 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 60:40) provided **4.8** (58 mg, 47 %) as a colorless oil. **R_f** = 0.15 (hexanes/EtOAc, 60:40); [α]_D²⁵ +32 (*c* 0.44, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₇H₂₁ClO₆S; **MW** 388.8590 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3463, 2928, 2872, 1759, 1407, 1167, 1090, 1048 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.51 – 7.48 (m, 2H), 7.41 – 7.37 (m, 3H), 5.51 (s, 1H), 4.98 (dd, *J* = 9.7,

3.6 Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J = 12.5, 1.5$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.10 (dd, $J = 12.5, 6.8$ Hz, 1H), 4.05 (dd, $J = 12.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.61 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 2.91 – 2.74 (m, 2H), 2.43 (s, 1H), 1.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 167.2, 137.5, 129.1, 128.2, 126.2, 101.1, 85.9, 76.5, 73.5, 69.8, 69.2, 66.3, 40.9, 23.4, 15.3 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{ClNaO}_6\text{S}$ 411.0640; Found 411.0639 (-0.06 ppm).

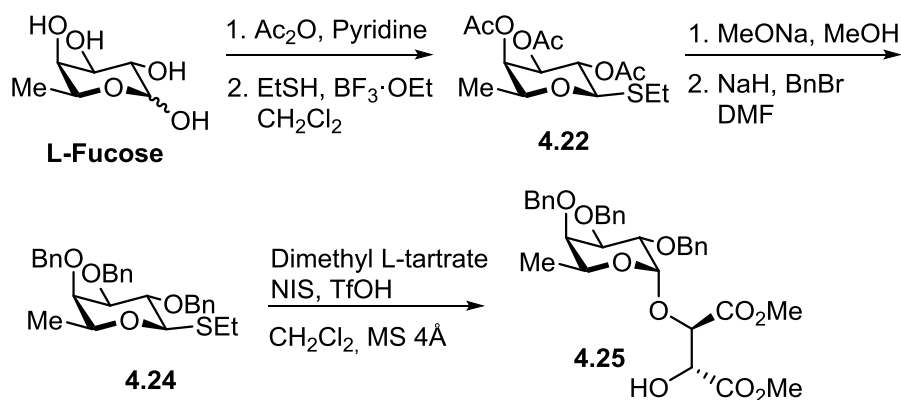
(2*S*,4*aR*,6*S*,7*R*,8*S*,8*aR*)-6-(Ethylthio)-8-hydroxy-2-phenylhexahydropyrano[3,2-*d*][1,3]dioxin-7-yl benzoate (4.14)



To a solution of **4.2** (0.10 g, 0.45 mmol, 1.0 eq.) in 2,2-dimethoxypropane (9 mL, 0.05 M) was added CSA (21 mg, 0.089 mmol, 0.20 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours then triethylamine (0.29 mL, 2.1 mmol, 4.7 eq.) was added. The mixture was filtered over Celite® and concentrated *in vacuo*. To the resulting residue was added CH_2Cl_2 (2.8 mL, 0.16 M), BzCl (65 μL , 0.56 mmol, 1.3 eq.), Et_3N (155 μL , 1.12 mmol, 2.50 eq.) and DMAP (11 mg, 0.089 mmol, 0.20 eq.). The reaction mixture was stirred for 5 hours, then the organic layer was washed successively with HCl 1 M (10 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL) and Brine (10 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in AcOH 80% (2.2 mL, 0.20 M) and the reaction mixture was stirred for 3 hours at 70°C before it was co-evaporated with toluene *in vacuo*. To the resulting residue was added MeCN (6 mL, 0.07 M), benzaldehyde dimethyl acetal (80 μL , 0.53 mmol, 1.2 eq.) and CSA (21 mg, 0.089 mmol, 0.20 eq.) After 4 hours, the reaction was quenched with Et_3N (0.29 mL, 2.1 mmol, 4.7 eq.) and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ EtOAc , 50:50) provided **4.14** (83 mg, 45 %) as a white powder. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.14**.³ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.61 – 7.53 (m, 3H), 7.49 – 7.42 (m, 5H), 5.60 (s, 1H), 5.48 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.10 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J =$

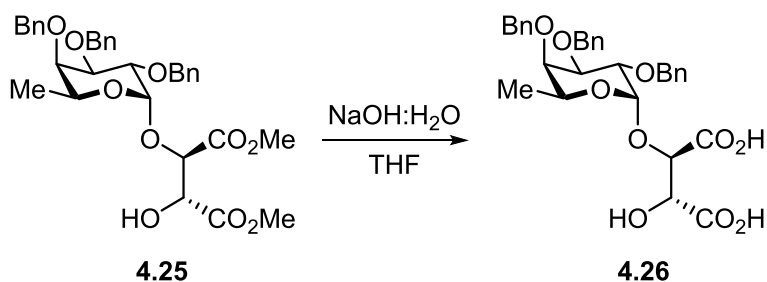
5.6 Hz, 1H), 3.63 (s, 1H), 2.96 – 2.87 (m, 1H), 2.82 – 2.71 (m, 1H), 1.32 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 137.4, 133.2, 129.9, 129.8, 129.4, 128.4, 128.3, 126.4, 101.6, 82.6, 75.8, 72.7, 70.7, 70.1, 69.2, 23.0, 14.9.

Dimethyl (2*R*,3*R*)-2-hydroxy-3-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.25)



Synthesis of compound **4.25** have already been reported and characterized by our laboratory.²

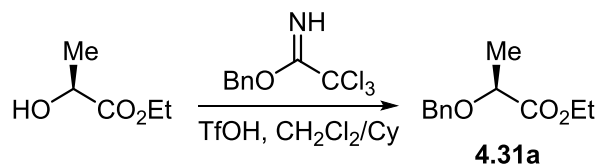
(2*R*,3*R*)-2-Hydroxy-3-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinic acid (4.26)



To a solution of diester **4.25** (3.3 g, 5.9 mmol, 1.0 eq.) in THF (56 mL, 0.10 M) at 25°C was added a 10 % NaOH solution (33 mL, 0.18 M). The reaction mixture was stirred 30 minutes and a 1M HCl solution was added until pH 3. The aqueous layer was extracted with EtOAc (4 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The desired diacid **4.26** (3.1 g, 99 %) was obtained as a white solid that was used without further purification. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -93$ (c 1.7, MeOH); **Formula** $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$; **MW**

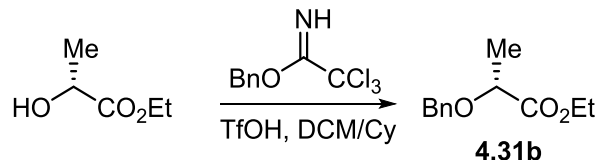
566.6030 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3449, 3027, 2936, 2877, 2097, 1737, 1454, 1100, 1047 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 7.52 – 7.22 (m, 15H), 5.05 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.89 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.63 – 4.58 (m, 3H), 4.41 (appq, J = 6.4 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 10.3, 2.8 Hz, 1H), 3.99 (dd, J = 10.3, 3.8 Hz, 1H), 3.83 (appd, J = 2.5 Hz, 1H), 1.09 (d, J = 6.5 Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 172.7, 171.4, 138.8, 138.6, 137.8, 128.4, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 127.2, 99.3, 78.6, 78.1, 78.0, 75.8, 74.9, 72.7, 72.5, 72.2, 67.5, 15.4 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{NaO}_{10}$ 589.2044; Found 589.2036 (-1.46 ppm).

Ethyl (*S*)-2-(benzyloxy)propanoate (**4.31a**)



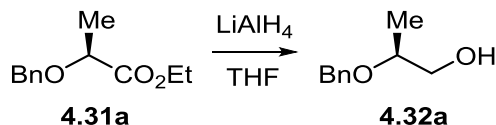
To a solution of Ethyl-L-lactate (1.0 mL, 11 mmol, 1.0 eq.) in a 2:1 mixture of cyclohexane/ CH_2Cl_2 (38 mL, 0.30 M) at 0°C was added benzyl 2,2,2-trichloroacetimidate (3.2 mL, 17 mmol, 1.5 eq.) followed by TfOH (0.20 mL, 2.3 mmol, 0.20 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 h at 0°C . Upon addition of Et_3N (0.40 mL, 2.9 mmol, 0.25 eq.), the reaction mixture was warmed to room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was suspended in cold hexanes, filtered to remove salts and the filtrate was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ Et_2O , 90:10), provided **4.31a** (1.9 g, 78 %) as a clear liquid. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.31a**.⁴ $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -67 (c 1.4, CH_2Cl_2); **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.34 (m, 4H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 4.72 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.29 – 4.19 (m, 2H), 4.07 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 1.46 (d, 3H), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 137.6, 128.4, 127.9, 127.8, 74.1, 72.0, 60.9, 18.7, 14.2 ppm.

Ethyl (*R*)-2-(benzyloxy)propanoate (**4.31b**)



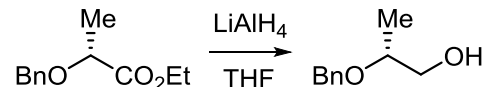
Compound **4.31b** was prepared from Ethyl-D-lactate (0.96 mL, 8.5 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.31a**, using a 2:1 mixture of cyclohexane/CH₂Cl₂ (28 mL, 0.30 M), benzyl 2,2,2-trichloroacetimidate (2.4 mL, 13 mmol, 1.5 eq.), TfOH (0.15 mL, 1.7 mmol, 0.20 eq.) and Et₃N (0.29 mL, 2.1 mmol, 0.25 eq.). Purification by flash chromatography (hexanes/Et₂O, 90:10) provided **4.31b** (1.6 g, 89 %) as a clear liquid. [α]_D²⁵ +71 (*c* 0.77, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.34 (m, 4H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.29 – 4.19 (m, 2H), 4.07 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.46 (d, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 137.6, 128.4, 127.9, 127.8, 74.1, 72.0, 60.9, 18.7, 14.2 ppm.

(*S*)-2-(Benzyloxy)propan-1-ol (**4.32a**)



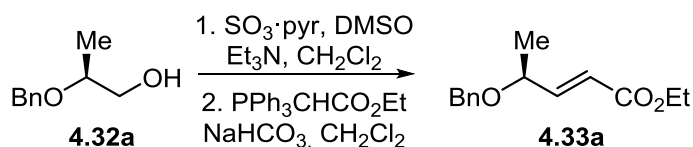
To a solution of LiAlH₄ (1.1 g, 28 mmol, 1.0 eq.) in THF (47 mL, 0.60 M) at 0°C was added dropwise a solution of **4.31a** (5.9 g, 28 mmol, 1.0 eq.) in THF (47 mL, 0.60 M). The reaction mixture was stirred for 40 min at 0°C, then Na₂SO₄·10H₂O (11.4 g, 35.4 mmol, 1.25 eq.) was added slowly. The reaction mixture was stirred at 0°C for 5 minutes, warmed to room temperature and stirred for another 45 minutes. The resulting mixture was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The desired alcohol **4.32a** (4.4 g, 93 %) was obtained as a clear liquid that was used without further purification. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.32a**.⁵ [α]_D²⁵ +39 (*c* 1.2, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.35 (m, 4H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 4.68 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 1H), 3.64 (dd, *J* = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 11.5, 7.1 Hz, 1H), 1.21 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.5, 128.5, 127.8, 127.7, 75.6, 70.8, 66.3, 15.9 ppm.

(R)-2-(Benzyloxy)propan-1-ol (4.32b)



Compound **4.32b** was prepared from **4.31b** according to procedure for **4.32a**, using a solution of LiAlH_4 (5.69 g, 150 mmol, 1.00 eq.) in THF (0.25 L, 0.60 M), a solution of **4.31b** (31.2 g, 150 mmol, 1.0 eq.) in THF (0.25 L, 0.60 M) and $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (60.4 g, 188 mmol, 1.25 eq.). The desired alcohol **4.32b** (24.5 g, 98 %) was obtained as a clear liquid that was used without further purification. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -44$ (c 1.1, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.35 (m, 4H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 4.68 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 1H), 3.64 (dd, J = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.53 (dd, J = 11.5, 7.1 Hz, 1H), 1.21 (d, J = 6.3 Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 138.5, 128.5, 127.8, 127.7, 75.6, 70.8, 66.3, 15.9 ppm.

Ethyl (S,E)-4-(benzyloxy)pent-2-enoate (4.33a)



To a solution of **4.32a** (1.2 g, 7.3 mmol, 1.0 eq.) and DMSO (5.6 mL, 88 mmol, 12 eq.) in CH_2Cl_2 (7.3 mL, 1.0 M) at 0°C was added Et_3N (4.1 mL, 29 mmol, 4.0 eq.) followed by $\text{SO}_3 \cdot \text{Pyr}$ (2.9 g, 18 mmol, 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour slowly warming up to room temperature. Water (10 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with Et_2O (2×10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. To the crude aldehyde in CH_2Cl_2 (37 mL, 0.20 M) was added NaHCO_3 (6.2 g, 73 mmol, 10 eq.) and (carbethoxymethylene) triphenylphosphorane (3.1 g, 8.8 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The resulting mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ Et_2O , 85:15) provided **4.33a** (1.3 g, 77 %) as a clear liquid. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.33a**.⁶ $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -46$ (c 1.0, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.29 (m, 5H), 6.91 (dd, J = 15.8, 6.1 Hz, 1H), 6.04 (dd, J = 15.7, 1.3 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.16 – 4.12

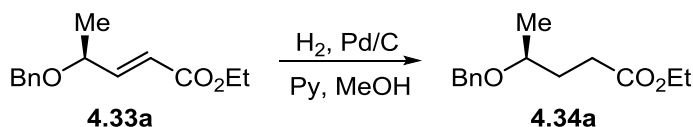
(m, 1H), 1.36 – 1.32 (m, 6H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 166.4, 149.2, 138.2, 128.4, 127.7, 127.6, 121.4, 73.9, 70.7, 60.5, 20.7, 14.3 ppm.

Ethyl (*R,E*)-4-(benzyloxy)pent-2-enoate (**4.33b**)



Compound **4.33b** was prepared from **4.32b** (1.06 g, 6.36 mmol, 1.00 eq.) according to procedure for **4.33a**, using DMSO (5.4 mL, 76 mmol, 12 eq.), CH_2Cl_2 (6.4 mL, 1.0 M) Et_3N (3.6 mL, 25 mmol, 4.0 eq.) and $\text{SO}_3\cdot\text{Pyr}$ (2.5 g, 16 mmol, 2.5 eq.) for the first step and CH_2Cl_2 (32 mL, 0.20 M), NaHCO_3 (5.3 g, 64 mmol, 10 eq.) and (carbethoxymethylene) triphenylphosphorane (2.4 g, 7.0 mmol, 1.1 eq.) for the second step. Purification by flash chromatography (hexanes/ Et_2O , 85:15) provided **4.33b** (1.2 g, 80 %) as a clear liquid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +45$ (*c* 0.91, CH_2Cl_2); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.29 (m, 5H), 6.91 (dd, *J* = 15.8, 6.1 Hz, 1H), 6.04 (dd, *J* = 15.7, 1.3 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.16 – 4.12 (m, 1H), 1.36 – 1.32 (m, 6H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 166.4, 149.2, 138.2, 128.4, 127.7, 127.6, 121.4, 73.9, 70.7, 60.5, 20.7, 14.3 ppm.

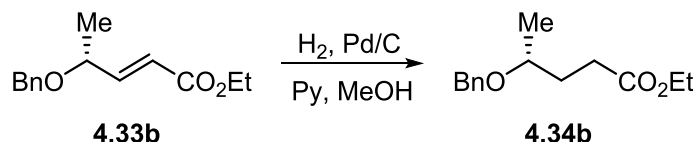
Ethyl (*S*)-4-(benzyloxy)pentanoate (**4.34a**)



To a solution of **4.33a** (1.3 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (28 mL, 0.20 M) was added pyridine (0.69 mL, 8.5 mmol, 1.5 eq.) and 10 % wt. Pd/C (0.60 g, 0.57 mmol, 0.10 eq.). The inert atmosphere was replaced by a positive pressure of H_2 , purging 3 times with vacuum. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours under 1 atm of H_2 . The resulting mixture was filtered over Celite[®] with MeOH and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ EtOAc , 90:10) provided **4.34a** (1.1 g, 84 %) as a clear liquid. R_f = 0.33 (hexanes/ EtOAc , 90:10); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +34$ (*c* 1.1, CH_2Cl_2); **Formula** $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$; **MW** 236.3110 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 2975, 2932, 2870, 1734, 1454, 1369, 1175, 1089 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36 (appd, *J* = 4.4 Hz, 4H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 4.59 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H),

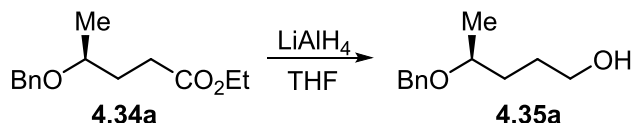
4.45 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.58 (sex, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.51 – 2.37 (m, 2H), 1.89 – 1.84 (m, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.8, 138.8, 128.3, 127.7, 127.5, 73.8, 70.4, 60.3, 31.7, 30.4, 19.5, 14.2 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NaO}_3$ 259.1305; Found 259.1302 (-1.07 ppm).

Ethyl (*R*)-4-(benzyloxy)pentanoate (**4.34b**)



Compound **4.34b** was prepared from **4.33b** (21.5 g, 91.8 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.34a**, using MeOH (0.46 L, 0.20 M), pyridine (11.1 mL, 138 mmol, 1.50 eq.) and 10 % wt. Pd/C (9.8 g, 9.2 mmol, 0.10 eq.). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 90:10) provided **4.34b** (20 g, 94 %) as a clear liquid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -33$ (c 1.3, CH_2Cl_2); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36 (appd, $J = 4.4$ Hz, 4H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 4.59 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.58 (sex, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.51 – 2.37 (m, 2H), 1.89 – 1.84 (m, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.8, 138.8, 128.3, 127.7, 127.5, 73.8, 70.4, 60.3, 31.7, 30.4, 19.5, 14.2 ppm.

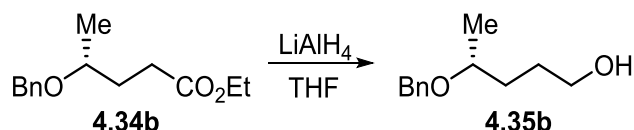
(*S*)-4-(Benzyloxy)pentan-1-ol (**4.35a**)



To a solution of LiAlH_4 (0.96 mg, 25 mmol, 1.0 eq.) in THF (43 mL, 0.60 M) at 0°C was added dropwise a solution of **4.34a** (6.0 g, 25 mmol, 1.0 eq.) in THF (43 mL, 0.60 M). The reaction mixture was stirred for 40 min at 0°C , then $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (10.2 g, 31.7 mmol, 1.25 eq.) was added slowly. The resulting mixture was stirred at 0°C for 5 minutes, warmed to room temperature, stirred for another 45 minutes then dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The desired alcohol **4.35a** (4.0 g, 81 %) was obtained as a clear liquid that was used without further purification. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.35a**.⁷ $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +28$ (c 0.94, CH_2Cl_2); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.35 (m, 4H), 7.31 – 7.29 (m, 1H), 4.62 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J = 6.1$ Hz,

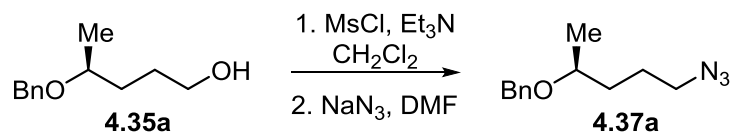
2H), 3.63 – 3.58 (m, 1H), 1.73 – 1.63 (m, 4H), 1.25 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 138.6, 128.4, 127.7, 127.6, 74.7, 70.4, 62.8 (d, $J = 7.4$ Hz), 33.2, 28.8, 19.4 ppm.

(*R*)-4-(Benzyloxy)pentan-1-ol (4.35b)



Compound **4.35b** was prepared from **4.34b** according to procedure for **4.35a**, using a solution of LiAlH_4 (0.16 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) in THF (7.4 mL, 0.60 M), a solution of **4.34b** (1.03 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) in THF (7.4 mL, 0.60 M) and $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (1.76 g, 5.45 mmol, 1.25 eq.). The desired alcohol **4.35b** (0.83 g, 98 %) was obtained as a clear liquid that was used without further purification. $[\alpha]_D^{25} -30$ (c 1.9, CH_2Cl_2); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.35 (m, 4H), 7.31 – 7.29 (m, 1H), 4.62 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.63 – 3.58 (m, 1H), 1.73 – 1.63 (m, 4H), 1.25 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 138.6, 128.4, 127.7, 127.6, 74.7, 70.4, 62.8 (d, $J = 7.4$ Hz), 33.2, 28.8, 19.4 ppm.

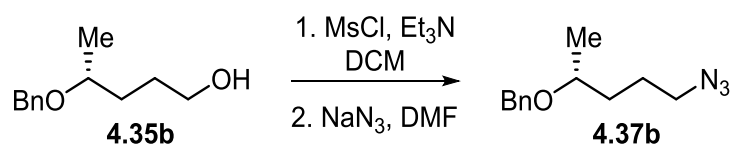
(*S*)-(((5-Azidopentan-2-yl)oxy)methyl)benzene (4.37a)



To a solution of **4.35a** (0.85 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (22 mL, 0.20 M) at 0°C was added Et_3N (0.73 mL, 5.7 mmol, 1.3 eq.) followed by MsCl (0.37 mL, 4.8 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 0°C , then water (20 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2×20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. To the crude mesylate **4.36a** in DMF (22 mL, 0.20 M) at room temperature was added NaN_3 (1.1 g, 17 mmol, 4.0 eq.). The reaction mixture was stirred at 100°C for 16 hours. Brine (15 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with a 1:1 mixture of hexanes/ Et_2O (15 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ Et_2O , 90:10)

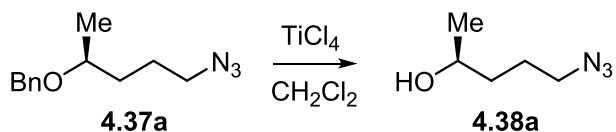
provided **4.37a** (0.74 g, 77 %) as a pale yellow oil. R_f = 0.42 (hexanes/EtOAc, 90:10); $[\alpha]_D^{25} +28$ (c 1.0, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₂H₁₇N₃O; **MW** 219.2880 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2931, 2867, 2094, 1453, 1258, 1065 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.34 (m, 4H), 7.32 – 7.29 (m, 1H), 4.61 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.33 – 3.24 (m, 2H), 1.83 – 1.53 (m, 4H), 1.24 (d, J = 6.1 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 138.8, 128.4, 127.7, 127.5, 74.1, 70.4, 51.5, 33.7, 25.0, 19.6 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : [M+Na]⁺ Calcd for C₁₂H₁₇N₃NaO 242.1264; Found 242.1264 (+0.17 ppm).

(S)-(((5-Azidopentan-2-yl)oxy)methyl)benzene (4.37b)



Compound **4.37b** was prepared from **4.35b** (16.7 g, 86.0 mmol, 1.00 eq.) according to procedure for **4.37a**, using CH₂Cl₂ (0.43 L, 0.20 M), Et₃N (15.6 mL, 112 mmol, 1.30 eq.) and MsCl (7.3 mL, 95 mmol, 1.1 eq.) for the first step and DMF (0.43 L, 0.20 M) and NaN₃ (22.4 g, 344 mmol, 4.00 eq.) for the second step. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 90:10) provided **4.37b** (18 g, 97 %) as a pale yellow oil. $[\alpha]_D^{25} -29$ (c 0.67, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.34 (m, 4H), 7.32 – 7.29 (m, 1H), 4.61 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.60 – 3.53 (m, 1H), 3.33 – 3.24 (m, 2H), 1.83 – 1.53 (m, 4H), 1.24 (d, J = 6.1 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 138.8, 128.4, 127.7, 127.5, 74.1, 70.4, 51.5, 33.7, 25.0, 19.6 ppm.

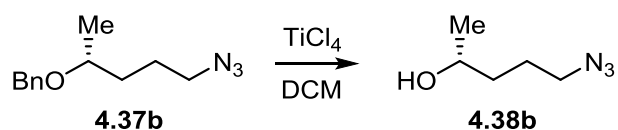
(S)-5-Azidopentan-2-ol (4.38a)



To a solution of **4.37a** (4.5 g, 21 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (104 mL, 0.200 M) at 0°C was added a 0.1 M solution of TiCl₄ in CH₂Cl₂ (31 mL, 31 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 0°C for 20 minutes. A saturated aqueous solution of NH₄Cl (100 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography

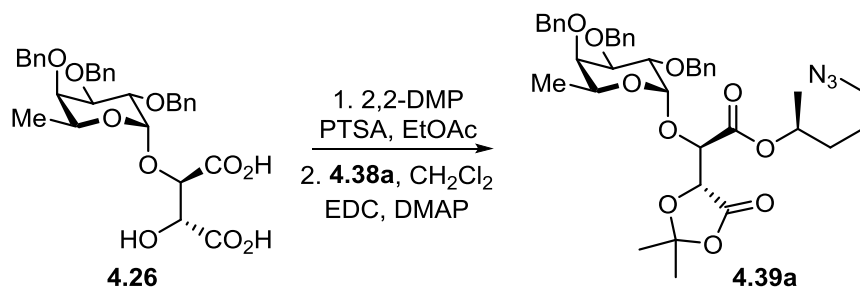
(hexanes/EtOAc, 55:45) provided **4.38a** (4.6 g, 61 %) as a yellow oil. R_f = 0.20 (hexanes/EtOAc, 70:30); $[\alpha]_D^{25} +14$ (c 0.56, CH₂Cl₂); **Formula** C₅H₁₁N₃O; **MW** 129.1630 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3355, 2968, 2931, 2871, 2093, 1454, 1256, 1132 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (sex, J = 6.2 Hz, 1H), 3.33 (td, J = 6.8, 1.2 Hz, 2H), 1.80 – 1.62 (m, 2H), 1.57 – 1.48 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.2 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 67.6, 51.5, 36.2, 25.2, 23.7 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : [M+Na]⁺ Calcd for C₅H₁₁N₃NaO 152.0794; Found 152.0790 (-2.87 ppm).

(*R*)-5-Azidopentan-2-ol (4.38b)



Compound **4.38b** was prepared from **4.37b** (0.65 mg, 3.0 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.38a**, using CH₂Cl₂ (15 mL, 0.20 M) and a 0.1 M solution of TiCl₄ in CH₂Cl₂ (4.5 mL, 4.5 mmol, 1.5 eq.). Purification by flash chromatography (hexanes/Et₂O, 55:45) provided **4.38b** (0.25 g, 64 %) as a yellow oil. $[\alpha]_D^{25} -10$ (c 0.42, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (sex, J = 6.2 Hz, 1H), 3.33 (td, J = 6.8, 1.2 Hz, 2H), 1.80 – 1.62 (m, 2H), 1.57 – 1.48 (m, 2H), 1.23 (d, J = 6.2 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 67.6, 51.5, 36.2, 25.2, 23.7 ppm.

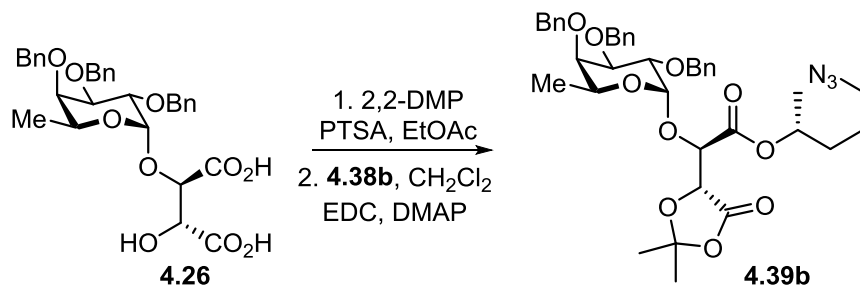
(*S*)-5-Azidopentan-2-yl (R)-2-((*R*)-2,2-dimethyl-5-oxo-1,3-dioxolan-4-yl)-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)acetate (4.39a)



To a solution of **4.26** (1.9 g, 3.3 mmol, 1.0 eq.) in EtOAc (11 mL, 0.30 M) was added 2,3-dimethoxypropane (4.32 mL, 35.1 mmol, 10.7 eq.) and PTSA (6 mg, 0.03 mmol, 0.01 eq.). The reaction mixture was heated to 75°C and stirred for 16 hours. After *in vacuo* concentration of

the reaction mixture, the resulting residue (dioxolanone **4.27**) is dissolved in CH₂Cl₂ (33 mL, 0.10 M) at room temperature and treated with **4.38a** (0.64 g, 4.9 mmol, 1.5 eq.), EDC (0.76 g, 3.9 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (80 mg, 0.66 mmol, 0.20 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours, then water (30 mL) and EtOAc (30 mL) were added. The aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 85:15) provided **4.39a** (1.0 g, 44 %) as a colorless oil. **R_f** = 0.43 (hexanes/EtOAc, 70:30); [α]_D²⁵ –60 (*c* 1.8, CH₂Cl₂); **Formula** C₃₉H₄₇N₃O₁₀; **MW** 717.8160 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3031, 2981, 2935, 2097, 1791, 1758, 1267, 1048 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.47 – 7.44 (m, *J* = 10.2 Hz, 2H), 7.40 – 7.27 (m, 13H), 5.07 – 4.98 (m, 3H), 4.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.86 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.36 (appq, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 10.3, 3.7 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, 1H), 3.71 – 3.69 (m, 1H), 3.31 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.71 – 1.61 (m, 4H), 1.59 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 169.9, 168.3, 138.9, 138.6, 138.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 127.6, 127.4, 127.4, 127.3, 113.0, 100.7, 78.6, 77.8, 76.9, 76.1, 76.0, 74.8, 72.9, 72.7, 72.0, 67.7, 51.0, 32.9, 27.4, 26.7, 24.8, 19.9, 16.6 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₃₉H₄₇N₃NaO₁₀ 740.3154; Found 740.3157 (+0.40 ppm).

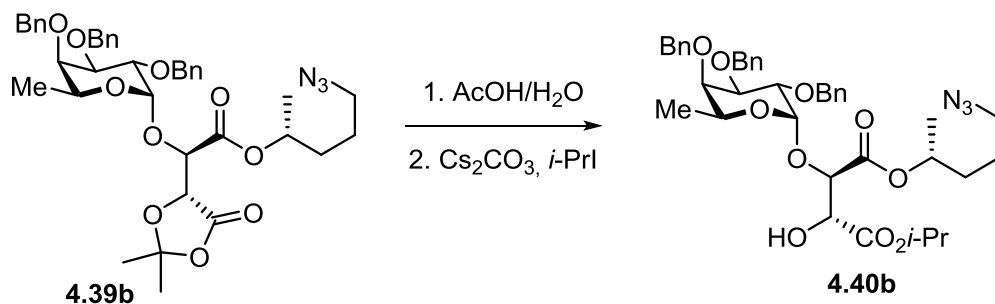
(R)-5-Azidopentan-2-yl **(R)-2-((R)-2,2-dimethyl-5-oxo-1,3-dioxolan-4-yl)-2-(((2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)acetate (4.39b)**



Compound **4.39b** was prepared from **4.26** (500 mg, 0.88 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.39a**, using EtOAc (2.9 mL, 0.30 M), 2,3-dimethoxypropane (1.16 mL, 9.44 mmol, 10.7 eq.) and PTSA (2 mg, 0.009 mmol, 0.01 eq.) for the first step and CH₂Cl₂ (8.8 mL, 0.10 M),

The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 70:30) provided **4.40a** (0.75 g, 73 %) as a colorless oil. **R_f** = 0.24 (hexanes/EtOAc, 70:30); [**α**]_D²⁵ –21 (*c* 0.38, CH₂Cl₂); **Formula** C₃₉H₄₉N₃O₁₀; **MW** 719.8320 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2979, 2936, 2096, 1754, 1454, 1262, 1103, 1052 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40 – 7.28 (m, 15H), 5.05 – 4.96 (m, 3H), 4.93 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.82 – 4.78 (m, 2H), 4.77 – 4.72 (m, 2H), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.27 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.10 – 4.03 (m, 2H), 3.72 (apps, 1H), 3.31 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.73 – 1.57 (m, 5H), 1.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 170.0, 168.9, 138.6, 138.5, 138.2, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 100.4, 79.5, 78.5, 77.5, 75.7, 74.9, 73.7, 72.8, 72.4, 71.8, 69.9, 67.7, 51.1, 33.0, 24.9, 21.8, 21.7, 19.9, 16.6 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₃₉H₄₉N₃NaO₁₀ 742.3310; Found 742.3284 (-3.55 ppm).

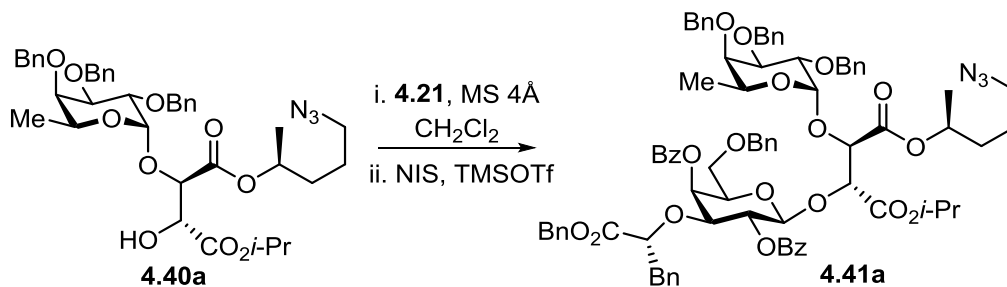
1-((*R*)-5-Azidopentan-2-yl) 4-isopropyl (2*R*,3*R*)-3-hydroxy-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5 - tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.40b**)**



Compound **4.40b** was prepared from **4.39b** (2.1 g, 2.9 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.40a**, using a 8:2 mixture of AcOH/H₂O (57 mL, 0.050 M) for the first step and DMF (29 mL, 0.10 M), Cs₂CO₃ (11 g, 3.4 mmol, 1.2 eq.) and *i*-PrI (0.43 mL, 4.3 mmol, 1.5 eq.) for the second step. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 70:30) provided **4.40b** (1.1 g, 55 %) as a colorless oil. **R_f** = 0.31 (hexanes/EtOAc, 70:30); [**α**]_D²⁵ –66 (*c* 1.3, CH₂Cl₂); **Formula** C₃₉H₄₉N₃O₁₀; **MW** 719.8320 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2986, 2938, 2096, 1753, 1451, 1263, 1103, 1052 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40 – 7.27 (m, 15H), 5.07 – 4.94 (m, 4H), 4.80 (appd, *J* = 11.6 Hz, 2H), 4.75 (appd, *J* = 11.6, 2H), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.30 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.11 – 4.05 (m, 2H), 3.73

(apps, 1H), 3.31 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.72 – 1.59 (m, 4H), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.23 (m, 6H), 1.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.0, 168.7, 138.6, 138.5, 138.2, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 100.2, 79.5, 78.3, 77.5, 75.7, 74.9, 73.7, 72.8, 72.3, 71.7, 69.9, 67.7, 51.1, 32.9, 24.7, 21.8, 21.7, 20.0, 16.6 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_{10}$ 742.3310; Found 742.3313 (+0.44 ppm).

1-((*S*)-5-Azidopentan-2-yl) 4-isopropyl (2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis (benzyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy) methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.41a)



A solution of thiogalactoside **4.21** (0.22 g, 0.29 mmol, 1.0 eq.) and fucoside **4.40a** (0.218 g, 0.30 mmol, 1.05 eq) in CH_2Cl_2 (2.9 mL, 0.10 M) was stirred 2 hours with 4Å molecular sieves (1.0 g/mmol). The mixture was cooled at -30°C and NIS (0.19 mg, 0.87 mmol, 3.0 eq.) was added followed by TMSOTf (10 μL , 0.058 mmol, 0.20 eq.). After 1 hour, EtOAc (15 mL) was added and the mixture was filtrated to remove the molecular sieves and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (20 mL), 1 M aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL), water (2 x 20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes:EtOAc, 70:30) provided **4.41a** (0.31 g, 75 %) as a colorless foam. $R_f = 0.40$ (hexanes/EtOAc, 70:30); $[\alpha]_D^{25} -5.5$ (c 0.82, CH_2Cl_2); **Formula** $\text{C}_{82}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{O}_{19}$; **MW** 1418.6000 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3031, 2979, 2931, 2096, 1729, 1453, 1267, 1106 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.10 – 8.05 (m, 4H), 7.58 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.49 – 7.40 (m, 5H), 7.38 – 7.18 (m, 23H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.96 – 6.87 (m, 5H), 5.71 (appd, $J = 3.3$ Hz, 1H), 5.53 (dd, $J = 9.9, 8.0$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.97 – 4.89 (m, 2H), 4.88 – 4.83 (m, 2H), 4.83 – 4.77 (m, 1H), 4.77 – 4.71 (m, 2H), 4.71 – 4.65 (m, 2H),

4.64 – 4.57 (m, 3H), 4.53 – 4.46 (m, 2H), 4.44 – 4.37 (m, 2H), 4.08 (appq, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.97 – 3.88 (m, 2H), 3.82 (dd, $J = 9.9, 3.3$ Hz, 1H), 3.71 (appt, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 9.3, 5.6$ Hz, 1H), 3.52 (apps, 1H), 3.47 (dd, $J = 9.4, 7.5$ Hz, 1H), 3.20 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.84 (dd, $J = 13.6, 5.6$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 13.7, 7.0$ Hz, 1H), 1.56 – 1.44 (m, 4H), 1.22 – 1.16 (m, 9H), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 168.1, 167.9, 165.7, 165.4, 138.9, 138.9, 138.7, 137.6, 135.6, 135.2, 133.2, 132.6, 130.6, 130.0, 130.0, 129.5, 129.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.5, 127.4, 127.3, 126.3, 100.2, 99.6, 79.4, 77.8, 77.7, 77.5, 77.1, 76.7, 75.7, 74.7, 73.8, 72.9, 72.8, 72.4, 71.5, 71.2, 69.0, 67.7, 67.4, 66.3, 66.2, 51.1, 39.1, 32.8, 24.8, 21.6, 21.6, 19.7, 16.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{82}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{NaO}_{19}$ 1440.5826; Found 1440.5793 (-2.28 ppm).

1-((*R*)-5-Azidopentan-2-yl) 4-isopropyl (2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis (benzyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy) methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.41b)

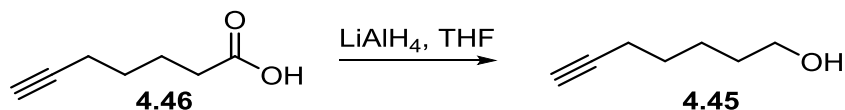


Compound **4.41b** was prepared from **4.40b** (1.11 g, 1.55 mmol, 1.05 eq.) according to procedure for **4.41a**, using **4.21** (1.1 g, 1.5 mmol, 1.0 eq.), CH_2Cl_2 (15 mL, 0.10 M) NIS (0.99 g, 4.4 mmol, 3.0 eq.) and TMSOTf (53 μL , 0.29 mmol, 0.20 eq.). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 70:30) provided **4.41b** (1.3 g, 60 %) as a colorless foam. $R_f = 0.37$ (hexanes/EtOAc, 70:30); $[\alpha]_D^{25} -8.1$ (c 1.8, CH_2Cl_2); **Formula** $\text{C}_{82}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{O}_{19}$; **MW** 1418.6000 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3033, 2985, 2936, 2094, 1724, 1450, 1262, 1106 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.13 – 8.10 (m, 2H), 8.09 – 8.06 (m, 2H), 7.61 – 7.56 (m, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 5H), 7.39 – 7.19 (m, 23H), 6.99 – 6.90 (m, 7H), 5.72 (appd, $J = 3.3$ Hz, 1H), 5.51 (dd, $J = 9.9, 8.1$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.98 – 4.90 (m, 3H), 4.89 – 4.81 (m, 2H), 4.78 – 4.68 (m,

4H), 4.67 – 4.59 (m, 3H), 4.52 – 4.46 (m, 3H), 4.41 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.13 (appq, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.98 – 3.92 (m, 2H), 3.81 (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 1H), 3.75 – 3.71 (m, 1H), 3.62 (dd, $J = 9.3, 5.5$ Hz, 1H), 3.55 (apps, 1H), 3.47 (dd, $J = 9.2, 7.7$ Hz, 1H), 3.29 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.86 (dd, $J = 13.6, 5.6$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz, 1H), 1.73 – 1.54 (m, 4H), 1.21 – 1.17 (m, 6H), 1.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 168.1, 167.9, 165.7, 165.5, 138.9, 138.7, 137.6, 135.7, 135.3, 133.2, 132.5, 130.7, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.5, 127.4, 127.3, 126.3, 100.1, 99.2, 79.4, 77.5, 77.3*, 77.3*, 77.1*, 76.9*, 76.8, 75.8, 74.7, 73.8, 73.0, 72.8, 72.4, 71.3, 71.2, 69.0, 67.7, 67.4, 66.5, 66.2, 51.1, 39.2, 32.8, 24.6, 21.6, 21.6, 19.7, 16.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 1 peak is missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{82}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{NaO}_{19}$ 1440.5826; Found 1440.5811 (-1.04 ppm).

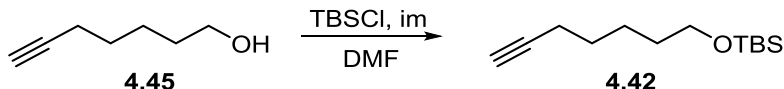
*Hidden under residual CHCl_3 peaks. Approximate displacement obtained from the HSQC spectrum.

Hept-6-yn-1-ol (**4.45**)



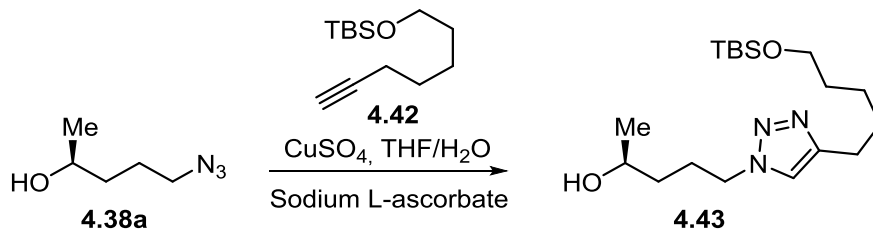
To a solution of 1M LiAlH_4 (5.9 mL, 5.9 mmol, 0.75 eq.) in THF (16 mL, 0.50 M) cooled to 0°C was added 6-heptynoic acid **4.46** (1.0 mL, 7.9 mmol, 1 eq.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C for 3 hours, then $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ was added portionwise. The resulting mixture was stirred for 10 min at 0°C , 30 minutes at room temperature, then dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The desired product **4.45** (0.71 g, 80 %) was obtained as a colorless liquid, which was used without further purification. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.45**.⁸ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.68 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.23 (dt, $J = 6.9, 2.5$ Hz, 2H), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 1.64 – 1.48 (m, 6H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 84.4, 68.3, 62.8, 32.2, 28.2, 24.9, 18.4 ppm.

***tert*-Butyl(hept-6-yn-1-yloxy)dimethylsilane (4.42)**



To a solution of **4.45** (0.33 g, 3.0 mmol, 1.0 eq.) in DMF (3.3 mL, 0.90 M) was added successively imidazole (0.28 g, 4.2 mmol, 1.4 eq.) and TBSCl (0.49 g, 3.3 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature then was diluted with EtOAc (10 mL). The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL), water (10 mL) and brine (10 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to provide **4.42** (0.64 g, 95 %) as a colorless liquid that was used without further purification. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **4.42**.⁹ ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.21 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.95 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.59 – 1.53 (m, 4H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 0.91 (s, *J* = 2.9 Hz, 9H), 0.07 (s, 6H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 84.6, 68.1, 63.0, 32.3, 28.3, 26.0, 25.0, 18.4, 18.3, -5.3 ppm.

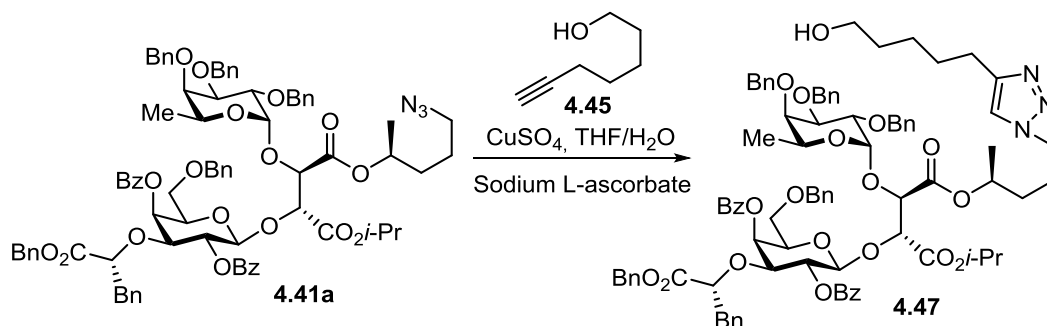
(*S*)-5-(4-(5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-ol (4.43)



To a solution of **4.38a** (50 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.) in a 3:1 mixture of THF/H₂O (4 mL, 0.1 M) was added CuSO₄·xH₂O (19 mg, 0.12 mmol, 0.30 eq.), sodium L-ascorbate (23 mg, 0.12 mmol, 0.30 eq.) and **4.42** (96 mg, 0.43 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours before addition of formic acid (15 μL, 0.39 mmol, 1.0 eq.) and stirring for an additional hour. A saturated aqueous solution of NaHCO₃ (5 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 20:80) provided **4.43** (72 mg, 52 %) as a colorless oil. *R*_f = 0.31 (hexanes/EtOAc, 20:80); [*α*]_D²⁵ +6.1 (*c* 2.2, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₈H₃₇N₃O₂Si; **MW** 355.5980 g/mol; **IR** (neat) *ν*_{max} 3369, 2928, 1463, 1251, 1098, 832, 773 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 7.28 (s, 1H), 4.34 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.84 (h, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.60 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.12 – 1.93

(m, 3H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.59 – 1.51 (m, 2H), 1.49 – 1.36 (m, 4H), 1.19 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.88 (s, $J = 1.2$ Hz, 9H), 0.04 (s, $J = 2.7$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 148.2, 120.5, 67.2, 63.1, 50.1, 35.6, 32.6, 29.2, 26.7, 26.0, 25.7, 25.5, 23.8, 18.4, -5.3 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}$ 356.2728; Found 356.2727 (-0.33 ppm).

4-((*S*)-5-(4-(5-Hydroxypentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-yl) 1-isopropyl (2*R*,3*R*)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-3-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.47)

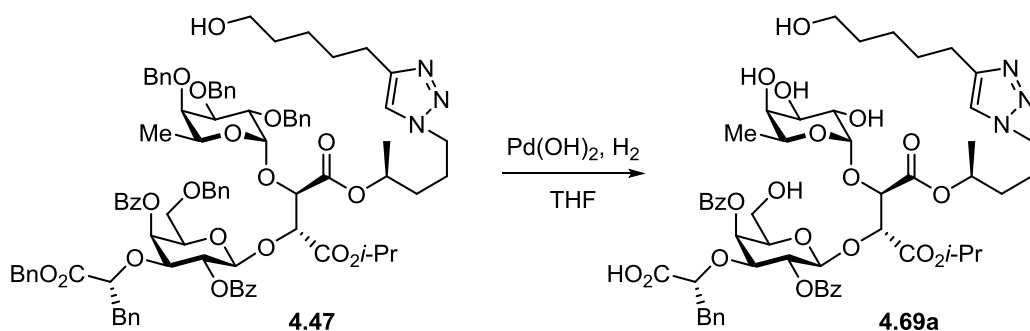


To a solution of **4.41a** (0.10 g, 0.070 mmol, 1.0 eq.) in a 3:1 mixture of THF/ H_2O (0.73 mL, 0.10 M) was added $\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (3.4 mg, 0.021 mmol, 0.30 eq.), sodium L-ascorbate (4.2 mg, 0.021 mmol, 0.30 eq.) and **4.45** (8.7 mg, 0.078 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours before addition of formic acid (2.7 μL , 0.071 mmol, 1 eq.) and stirring for an additional hour. A saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ EtOAc , 20:80) provided **4.47** (79 mg, 73 %) as a white foam. R_f = 0.19 (hexanes/ EtOAc , 20:80); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -4.9 (c 1.0, CH_2Cl_2); **Formula** $\text{C}_{89}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{20}$; **MW** 1530.7720 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3031, 2979, 2931, 1728, 1454, 1267, 1106 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) 8.10 – 8.03 (m, 4H), 7.59 (appt, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.50 – 7.17 (m, 29H), 7.01 – 6.86 (m, 7H), 5.72 (appd, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.53 (dd, $J = 9.5, 8.3$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.96 – 4.88 (m, 2H), 4.85 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.82 – 4.76 (m, 2H), 4.76 – 4.71 (m, 2H), 4.69 – 4.62 (m, 3H), 4.62 – 4.56 (m, 2H), 4.51 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.43 – 4.38 (m, 2H), 4.29 – 4.17 (m, 2H), 4.05 (appq, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 2H), 3.85

(dd, $J = 9.9, 3.1$ Hz, 1H), 3.74 (appt, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.63 – 3.56 (m, 3H), 3.53 (apps, 1H), 3.47 (dd, $J = 9.3, 7.4$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.7, 5.6$ Hz, 1H), 2.77 – 2.67 (m, 3H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.66 (m, 2H), 1.60 – 1.54 (m, 2H), 1.53 – 1.43 (m, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 2H), 1.20 – 1.16 (m, 9H), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 168.2, 167.9, 165.7, 165.5, 148.3, 138.9, 138.8, 138.6, 137.5, 135.6, 135.2, 133.3, 132.7, 130.6, 130.0, 129.5, 129.4, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.6, 127.6, 127.4, 127.3, 126.3, 121.2, 100.3, 99.6, 79.3, 78.1, 77.6, 77.5, 76.9*, 76.7, 75.8, 74.8, 73.8, 73.1, 72.7, 72.5, 71.3, 71.2, 69.2, 67.8, 67.5, 66.3, 66.2, 62.6, 50.0, 39.1, 32.4, 32.3, 29.0, 26.0, 25.5, 25.2, 21.6, 21.6, 19.7, 16.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 3 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{89}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{NaO}_{20}$ 1552.6714; Found 1552.6661 (-3.43 ppm).

*Hidden under residual CHCl_3 peaks. Approximate displacement obtained from the HSQC spectrum.

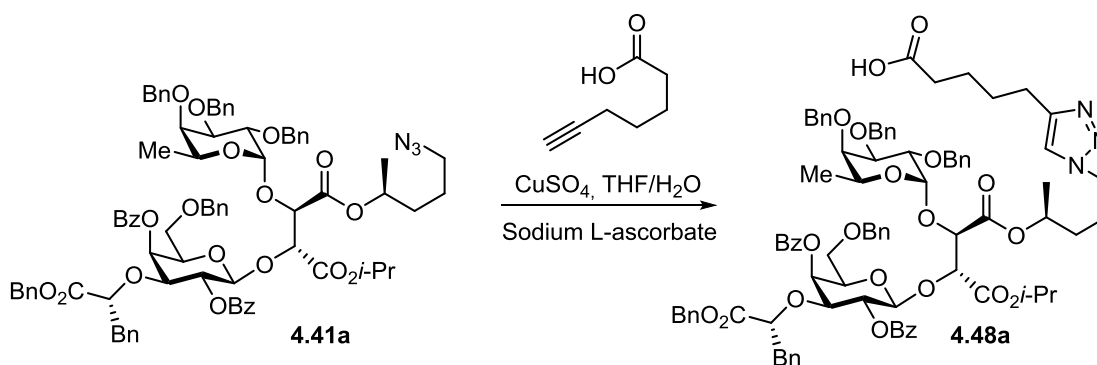
Sodium (R)-2-(((2R,3S,4S,5R,6S)-3,5-bis(benzoyloxy)-2-(hydroxymethyl)-6-(((2R,3R)-4-(((S)-5-(4-(5-hydroxypentyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-yl)oxy)-1-isopropoxy-1,4-dioxo-3-(((2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)butan-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy)-3-phenylpropanoate (4.69a)



Compound **4.69a** was prepared from **4.47** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (5.4 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (88.7 mg, 0.0947 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 70:30) provided **4.69a** (24 mg, 34 %) as a white solid. $R_f = 0.11$ ($\text{EtOAc}/i\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6:3:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +12$ (c 1.0, MeOH); **Formula** $\text{C}_{54}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{20}$; **MW** 1080.1470 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3382, 2931, 1724, 1594, 1451, 1270, 1096 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.18 (appd, $J = 7.6$ Hz,

2H), 8.04 (appd, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.65 (appt, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.58 (appt, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.54 – 7.44 (m, 4H), 7.07 (appd, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.85 (appt, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.76 (appt, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.81 (appd, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J = 9.6, 8.3$ Hz, 1H), 5.08 – 5.02 (m, 1H), 4.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.74 – 4.71 (m, 2H), 4.67 – 4.61 (m, 1H), 4.45 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.31 – 4.21 (m, 4H), 4.08 (appq, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.86 (appt, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H), 3.64 (dd, $J = 10.4, 3.9$ Hz, 1H), 3.60 – 3.54 (m, 5H), 2.80 (dd, $J = 13.4, 5.6$ Hz, 1H), 2.76 – 2.66 (m, 3H), 1.86 – 1.76 (m, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.63 – 1.54 (m, 2H), 1.52 – 1.36 (m, 4H), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.1, 168.6, 167.7, 166.7, 165.5, 147.7, 138.0, 132.8, 132.3, 130.8, 130.2, 129.7, 129.6, 129.1, 128.0, 127.8, 127.1, 125.2, 121.7, 102.0, 101.8, 78.4, 78.2*, 77.8, 75.1, 74.6, 72.1, 71.6, 71.4, 70.1, 69.7, 68.6, 67.3, 66.4, 61.4, 60.5, 49.4, 39.0, 32.2, 31.9, 29.0, 25.9, 25.1, 24.9, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{NaO}_{20}$ 1102.4367; Found 1102.4390 (+2.10 ppm).
 *This carbon does not appear clearly on the ^{13}C NMR, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-Bis(benzyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoic acid (4.48a)

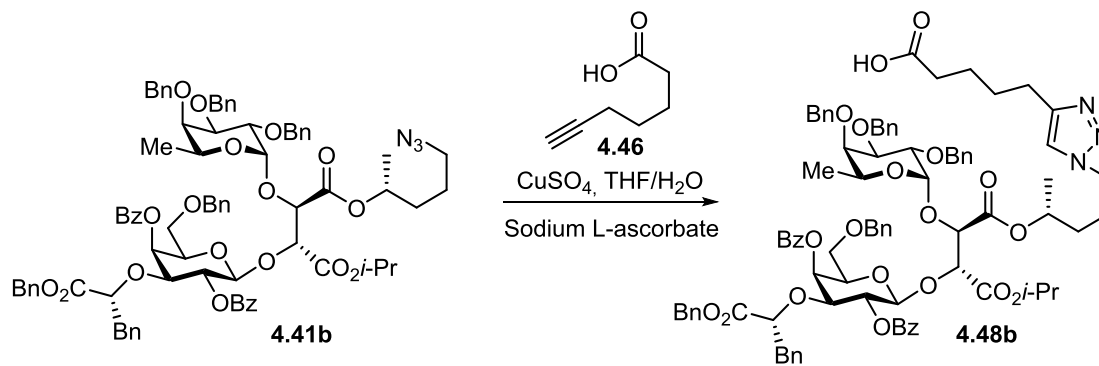


To a solution of **4.41a** (0.28 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq.) in a 3:1 mixture of THF/ H_2O (2 mL, 0.1 M) was added $\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (9 mg, 0.06 mmol, 0.3 eq.), sodium L-ascorbate (12 mg, 0.059 mmol, 0.30 eq.) and 6-Heptynoic acid (27 μL , 0.22 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 16 hours before addition of formic acid (7.4 μL , 0.059 mmol, 1.0 eq.) and stirring for

an additional hour. The mixture was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) provided **4.48a** (0.27 mg, 91 %) as a white foam. **R_f** = 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10); [α]_D²⁵ -7.5 (*c* 0.77, CH₂Cl₂); **Formula** C₈₉H₉₇N₃O₂₁; **MW** 1544.7550 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3027, 2925, 2850, 1717, 1449, 1268, 1105 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.12 – 8.04 (m, 4H), 7.59 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.50 – 7.20 (m, 29H), 7.01 – 6.88 (m, 7H), 5.73 (appd, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.55 (dd, *J* = 9.8, 8.1 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.97 – 4.90 (m, 2H), 4.86 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.82 – 4.77 (m, 1H), 4.77 – 4.67 (m, 4H), 4.65 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.52 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.29 – 4.16 (m, 2H), 4.08 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.95 – 3.89 (m, 2H), 3.86 (dd, *J* = 9.9, 3.2 Hz, 1H), 3.75 (appt, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J* = 9.4, 5.7 Hz, 1H), 3.53 (apps, 1H), 3.48 (dd, *J* = 9.3, 7.3 Hz, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.6, 5.6 Hz, 1H), 2.79 – 2.69 (m, 3H), 2.43 – 2.33 (m, 2H), 1.90 – 1.78 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 4H), 1.55 – 1.39 (m, 2H), 1.22 – 1.16 (m, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 176.8, 170.5, 168.1, 168.1, 165.6, 165.5, 148.2, 138.9, 138.8, 138.6, 137.5, 135.6, 135.2, 133.3, 132.6, 130.6, 130.0, 129.5, 129.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 126.3, 120.8, 100.3, 99.6, 79.2, 78.1, 77.6, 77.5, 77.3*, 76.7, 75.8, 74.8, 73.8, 73.1, 72.7, 72.5, 71.3, 71.2, 69.2, 67.8, 67.4, 66.3, 66.2, 49.7, 39.1, 33.7, 32.5, 28.6, 26.1, 25.1, 24.2, 21.6, 21.6, 19.7, 16.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₈₉H₉₇N₃NaO₂₁ 1566.6507; Found 1566.6515 (+0.53 ppm).

*Hidden under residual CHCl₃ peaks. Approximate displacement obtained from the HSQC spectrum.

5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-Bis(benzyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoic acid (4.48b)

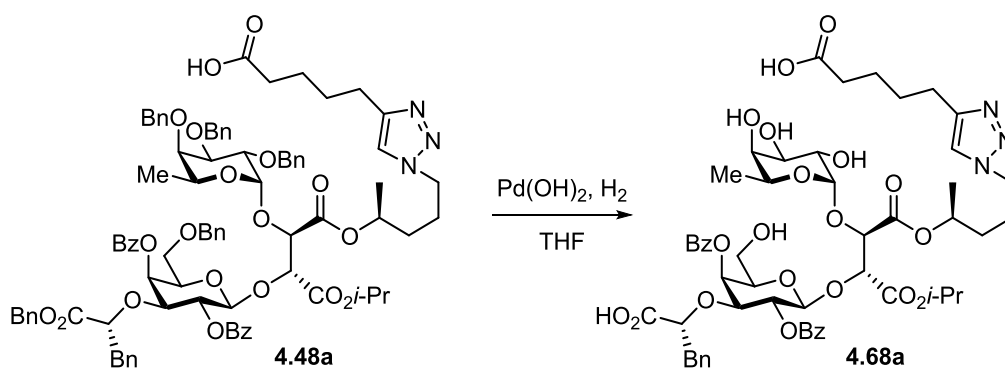


Compound **4.48b** was prepared from **4.41b** (1.25 mg, 0.881 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **4.48a**, using a 3:1 mixture of THF/H₂O (8.8 mL, 0.10 M), CuSO₄·xH₂O (42 mg, 0.26 mmol, 0.30 eq.), sodium L-ascorbate (52 mg, 0.26 mmol, 0.30 eq.), 6-Heptynoic acid (0.12 mL, 0.97 mmol, 1.1 eq.) and formic acid (33 μL, 0.88 mmol, 1.0 eq.). Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) provided **4.48b** (1.2 g, 86 %) as a white foam. *R_f* = 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5); [*α*]_D²⁵ −7.1 (*c* 1.5, CH₂Cl₂); **Formula** C₈₉H₉₇N₃O₂₁; **MW** 1544.7550 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3027, 2936, 2871, 1723, 1449, 1261, 1100 cm^{−1}; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (appd, *J* = 7.5 Hz, 2H), 8.00 (appd, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.57 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.53 – 7.18 (m, 29H), 6.98 – 6.91 (m, 7H), 5.72 (appd, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.51 (dd, *J* = 9.7, 8.3 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.96 – 4.89 (m, 4H), 4.81 – 4.72 (m, 3H), 4.71 – 4.59 (m, 5H), 4.51 – 4.46 (m, 3H), 4.41 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.38 – 4.30 (m, 2H), 4.20 (appq, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.00 – 3.94 (m, 2H), 3.82 – 3.77 (m, 2H), 3.66 (dd, *J* = 9.2, 5.3 Hz, 1H), 3.59 (apps, 1H), 3.50 – 3.45 (m, 1H), 2.86 (dd, *J* = 13.6, 5.6 Hz, 1H), 2.79 – 2.68 (m, 3H), 2.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.09 – 1.88 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 4H), 1.57 – 1.45 (m, 2H), 1.19 – 1.15 (m, 6H), 1.10 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 177.2, 170.6, 168.1, 168.0, 165.7, 165.7, 147.7, 138.8, 138.6, 137.5, 135.6, 135.2, 133.3, 132.7, 130.6, 130.0, 129.8, 129.6, 129.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.4, 127.3, 126.3, 121.2, 100.1, 99.1, 79.5, 77.8, 77.5*, 77.4*, 77.0*, 76.9, 75.8, 74.8, 73.8, 73.2, 72.7, 72.3, 71.3, 71.1, 69.2, 67.6, 67.5, 66.8, 66.2, 49.7, 39.2, 33.6, 32.4, 28.6, 25.8, 25.1, 24.2, 21.7, 21.6, 19.8, 16.5. ppm. Due to overlapping carbon signals in

the aromatic region, 3 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+H+Na]^{2+}$ Calcd for $C_{89}H_{97}N_3Na_2O_{21}$ 794.8199; Found 794.8192 (-0.95 ppm).

*Hidden under residual $CHCl_3$ peaks. Approximate displacement obtained from the HSQC spectrum.

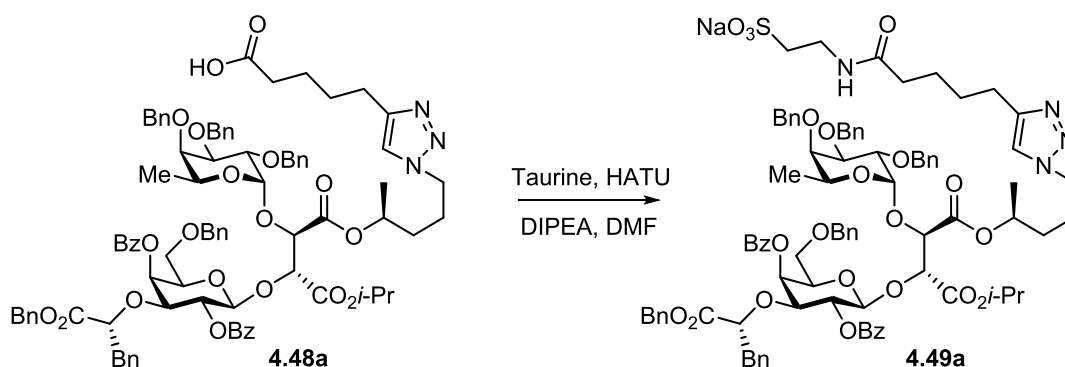
5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-Bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoic acid (4.68a**)**



Compound **4.68a** was prepared from **4.48a** (0.10 mg, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (5.4 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $Pd(OH)_2$ (87.9 mg, 0.0939 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $H_2O:MeOH$, 50:50) provided **4.68a** (50 mg, 71 %) as a white solid. R_f = 0.16 ($EtOAc/i-PrOH/H_2O$, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25} +8.9$ (c 1.4, $MeOH$); **Formula** $C_{54}H_{67}N_3O_{21}$; **MW** 1094.1300 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3398, 2936, 1724, 1572, 1452, 1270, 1086 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.21 (appd, J = 8.0 Hz, 2H), 8.03 (appd, J = 7.6 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.65 (appt, J = 7.5 Hz, 1H), 7.59 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 4H), 7.08 (appd, J = 7.3 Hz, 2H), 6.85 (appt, J = 7.6 Hz, 2H), 6.76 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, J = 2.5 Hz, 1H), 5.48 (dd, J = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 5.10 – 5.01 (m, 1H), 4.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.74 – 4.70 (m, 2H), 4.65 – 4.58 (m, 1H), 4.48 – 4.46 (m, 1H), 4.30 – 4.22 (m, 4H), 4.03 (appq, J = 6.4 Hz, 1H), 3.85 (appt, J = 6.3 Hz, 1H), 3.75 (dd, J = 10.3, 3.2 Hz, 1H), 3.69 – 3.64 (m, 1H), 3.60 – 3.56 (m, 3H), 2.80 (dd, J = 13.4, 5.7 Hz, 1H), 2.74 – 2.66 (m, 3H), 2.27 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.75 – 1.65 (m, 4H), 1.50 – 1.36 (m, 2H), 1.29 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (t, J = 7.8 Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 179.1, 176.7, 168.6, 167.7, 166.7,

166.6, 165.6, 147.6, 137.8, 132.9, 132.5, 130.7, 130.2, 129.7, 129.5, 129.1, 128.1, 127.8, 127.2, 125.3, 121.8, 102.1, 101.7, 79.4, 78.5, 77.5, 75.4, 74.5, 721, 71.6, 71.4, 70.1, 69.8, 68.5, 67.3, 66.5, 60.3, 49.4, 39.2, 35.7, 32.3, 28.9, 25.9, 25.2, 24.7, 20.7, 20.6, 19.0, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+2Na]^{2+}$ Calcd for $C_{54}H_{67}N_3Na_2O_{21}$ 569.7026; Found 569.7019 (-1.25 ppm).

Sodium 2-(5-(1-(((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)ethane-1-sulfonate (**4.49a**)



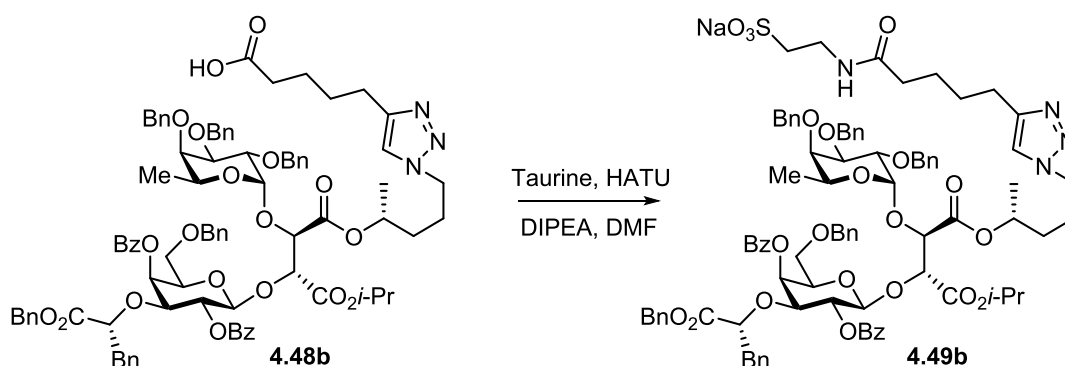
Compound **4.49a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and taurine (16 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeCN, 30:70) provided **4.49a** (90 mg, 83 %) as a white solid. R_f = 0.1 (CH_2Cl_2 /MeOH, 90:10); $[\alpha]_D^{25}$ -8.6 (c 2.2, MeOH); **Formula** $C_{91}H_{101}N_4NaO_{23}S$; **MW** 1673.8638 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 2862, 1721, 1452, 1265, 1174, 1104, 1048 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.10 – 8.05 (m, 4H), 7.70 (s, 1H), 7.65 – 7.60 (m, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 3H), 7.43 – 7.36 (m, 6H), 7.35 – 7.17 (m, 19H), 7.02 – 6.99 (m, 2H), 6.93 – 6.88 (m, 5H), 5.72 (appd, J = 3.0 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.92 – 4.89 (m, 1H)*, 4.86 – 4.81 (m, 2H), 4.80 – 4.65 (m, 8H), 4.61 – 4.49 (m, 3H), 4.45 – 4.39 (m, 2H), 4.26 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.07 (appq, J = 6.4 Hz, 1H), 3.96 – 3.92 (m, 2H), 3.89 – 3.83 (m, 2H), 3.66 (apps, 1H), 3.62 – 3.55 (m, 3H), 3.49 (dd, J = 9.6, 6.4 Hz, 1H), 2.96 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.83 (dd, J = 13.6, 5.5 Hz, 1H), 2.72 (dd, J = 13.6, 6.8 Hz, 1H), 2.64 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.87 – 1.73 (m, 2H), 1.68 –

1.58 (m, 4H), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.2, 170.7, 168.2, 168.1, 166.0, 165.8, 147.5, 138.9, 138.7, 138.6, 137.7, 135.5, 135.4, 133.2, 132.7, 130.4, 129.8, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.0, 121.9, 100.7, 99.4, 78.8, 77.7, 77.6**, 77.5, 77.3, 76.8, 75.4, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.0, 71.6, 71.3, 69.4, 67.8, 67.5, 67.0, 66.0, 50.1, 49.4, 38.8, 35.4, 35.2, 32.1, 28.6, 25.9, 24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.8, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{91}\text{H}_{101}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{23}\text{S}$ 1695.6367; Found 1695.6364 (-0.19 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

**This carbon does not appear clearly on the ^{13}C NMR, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

Sodium 2-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)ethane-1-sulfonate (4.49b)



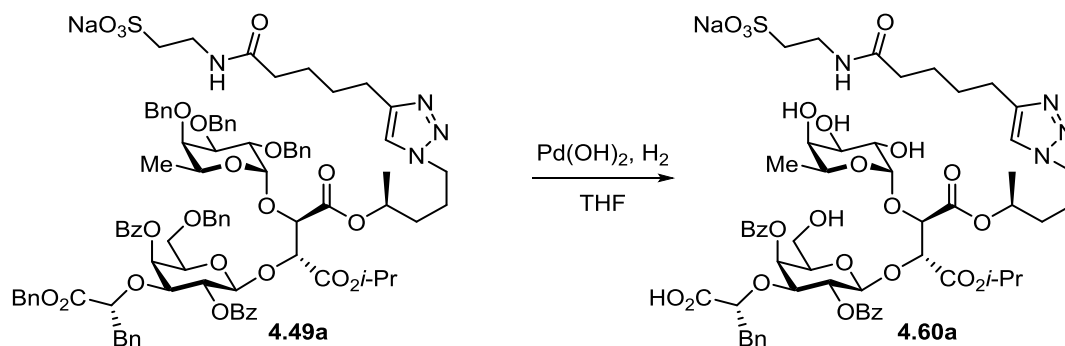
Compound **4.49b** was prepared from **4.48b** (0.12 g, 0.078 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.78 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (54 μL , 0.31 mmol, 3.0 eq.), HATU (38 mg, 0.10 mmol, 1.3 eq.) and taurine (19 mg, 0.16 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 50:50) provided **4.49b** (86 mg, 66 %) as a white solid. $R_f = 0.12$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -13$ (c 1.2, MeOH); **Formula** $\text{C}_{91}\text{H}_{101}\text{N}_4\text{NaO}_{23}\text{S}$; **MW** 1673.8638 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3419, 2979, 2936, 2866,

1728, 1648, 1449, 1261, 1100 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.12 – 8.08 (m, 2H), 8.06 – 8.02 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.61 (appt, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.55 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.48 – 7.39 (m, 6H), 7.38 – 7.16 (m, 21H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.94 – 6.88 (m, 5H), 5.75 (appd, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.49 (dd, $J = 9.9, 8.1$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.92 – 4.86 (m, 3H)*, 4.82 – 4.65 (m, 8H), 4.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.55 – 4.47 (m, 3H), 4.44 – 4.36 (m, 3H), 4.18 (appq, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.00 – 3.93 (m, 2H), 3.93 – 3.87 (m, 2H), 3.72 (apps, 1H), 3.64 – 3.58 (m, 3H), 3.53 – 3.49 (m, 1H), 2.97 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.84 (dd, $J = 13.6, 5.5$ Hz, 1H), 2.72 (dd, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 2.65 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.69 – 1.44 (m, 6H), 1.17 – 1.13 (m, 6H), 1.09 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 174.2, 170.8, 168.1, 168.0, 166.1, 165.8, 147.6, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.1, 132.6, 130.5, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 126.0, 122.0, 100.6, 99.3, 79.0, 77.8, 77.6, 77.6**, 77.3, 77.0, 75.6, 74.8, 73.2, 72.8, 72.3, 72.1, 71.4, 71.3, 69.3, 67.7, 67.5, 67.3, 65.9, 50.1, 49.5, 38.9, 35.4, 35.2, 32.1, 28.6, 25.8, 24.9, 24.6, 20.7, 20.6, 18.7, 15.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 5 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{91}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{23}\text{S}$ 848.3220; Found 848.3220 (-0.03 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

**This carbon does not appear clearly on the ^{13}C NMR, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

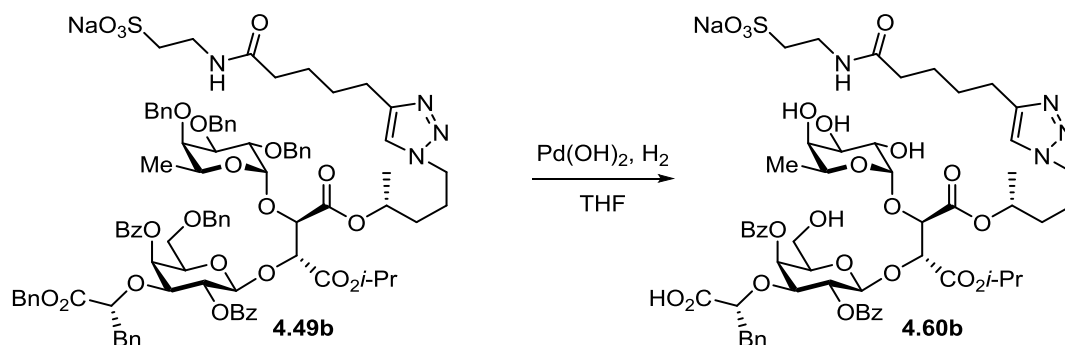
Sodium 2-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)ethane-1-sulfonate (4.60a)



Compound **4.60a** was prepared from **4.49a** (89 mg, 0.053 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (4.4 mL, 0.012 M) and 15 % wt. Pd(OH)₂ (72.0 mg, 0.0769 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeOH, 50:50) provided **4.60a** (51 mg, 77 %) as a white solid. R_f = 0.15 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ +8.8 (*c* 0.97, MeOH); **Formula** C₅₆H₇₁N₄NaO₂₃S; **MW** 1223.2388 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3414, 2981, 2931, 1723, 1599, 1449, 1266, 1089 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.25 – 8.21 (m, 2H), 8.03 – 8.00 (m, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.65 (appt, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 4H), 7.11 – 7.07 (m, 2H), 6.85 (appt, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.75 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 10.0, 8.0 Hz, 1H), 5.11 – 5.03 (m, 1H), 4.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.66 – 4.59 (m, 1H), 4.46 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.30 – 4.22 (m, 4H), 4.03 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.85 (appt, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 10.4, 3.2 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.2, 3.9 Hz, 1H), 3.63 – 3.56 (m, 5H), 2.98 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.82 (dd, *J* = 13.4, 5.8 Hz, 1H), 2.74 – 2.64 (m, 3H), 2.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.72 – 1.64 (m, 4H), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 1.30 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.27 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 177.1, 174.3, 169.0, 167.6, 167.1, 165.6, 147.4, 138.0, 132.9, 132.6, 130.6, 130.3, 129.7, 129.5, 129.1, 128.0, 127.9, 127.2, 125.3, 121.9, 102.1, 101.5, 79.9, 78.1, 77.1, 75.1, 74.7, 72.0, 71.8, 71.6, 70.1, 70.0, 68.3, 67.4, 66.5, 60.4, 50.1, 49.4, 39.3, 35.4, 35.2, 32.2, 28.6, 26.0,

24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+Na]^+$ Calcd for $C_{56}H_{71}N_4Na_2O_{23}S$ 1245.4020; Found 1245.4009 (-0.84 ppm).

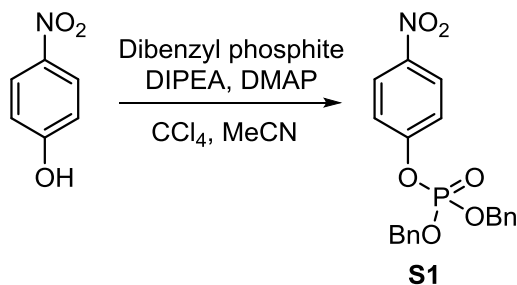
Sodium 2-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)ethane-1-sulfonate (**4.60b**)



Compound **4.60b** was prepared from **4.49b** (94 mg, 0.056 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (4.7 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $Pd(OH)_2$ (76.2 mg, 0.0814 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeOH, 60:40) provided **4.60b** (51 mg, 74 %) as a white solid. R_f = 0.06 (EtOAc/*i*-PrOH/ H_2O , 6:3:1); $[\alpha]_D^{25} +12$ (c 0.57, MeOH); **Formula** $C_{56}H_{71}N_4NaO_{23}S$; **MW** 1223.2388 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3414, 2979, 2936, 1723, 1631, 1449, 1267, 1084, 1036 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.24 – 8.21 (m, 2H), 8.00 – 7.96 (m, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.65 – 7.58 (m, 2H), 7.51 – 7.44 (m, 4H), 7.10 – 7.05 (m, 2H), 6.83 (appt, J = 7.6 Hz, 2H), 6.73 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 5.80 (appd, J = 2.9 Hz, 1H), 5.48 (dd, J = 10.0, 8.1 Hz, 1H), 5.07 – 5.01 (m, 1H), 4.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.76 – 4.72 (m, 2H), 4.70 – 4.62 (m, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 3H), 4.32 – 4.24 (m, 2H), 4.07 (appq, J = 6.6 Hz, 1H), 3.88 (appt, J = 6.3 Hz, 1H), 3.77 (dd, J = 10.2, 3.2 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 10.2, 3.9 Hz, 1H), 3.62 – 3.57 (m, 5H), 2.98 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.81 (dd, J = 13.5, 5.6 Hz, 1H), 2.74 – 2.67 (m, 3H), 2.24 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.00 – 1.86 (m, 2H), 1.71 – 1.64 (m, 4H), 1.60 – 1.51 (m, 1H), 1.49 – 1.39 (m, 1H), 1.28 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 176.8, 174.3, 168.7, 168.0, 166.9, 165.6, 147.5, 137.9, 132.9, 132.5, 130.7, 130.2, 129.6, 129.5, 129.1, 128.0, 127.8, 127.2,

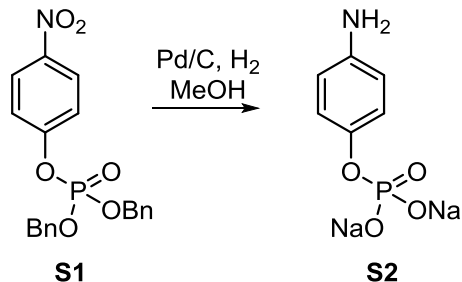
125.3, 122.2, 101.8, 101.5, 79.5, 78.1, 77.5, 75.2, 74.6, 72.1, 71.8, 71.5, 70.0, 69.9, 68.4, 67.3, 66.6, 60.5, 50.1, 49.6, 39.3, 35.4, 35.2, 32.1, 28.6, 25.9, 24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.5, 15.1 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+2Na]^{2+}$ Calcd for $C_{56}H_{71}N_4Na_3O_{23}S$ 634.1956; Found 634.1953 (-0.48 ppm).

Dibenzyl (4-nitrophenyl) phosphate (**S1**)



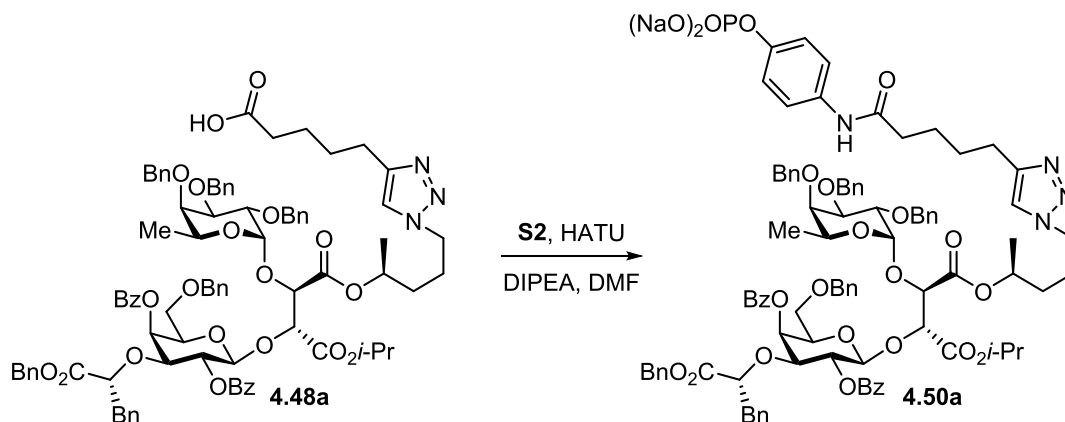
To a solution of 4-Nitrophenol (2.0 g, 14 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (0.14 L, 0.10 M) cooled at -10°C was added dibenzylphosphite (3.34 mL, 15.1 mmol, 1.05 eq.), DIPEA (5.3 mL, 30 mmol, 2.1 eq.), CCl_4 (7.4 mL, 76 mmol, 5.3 eq.) and DMAP (0.18 g, 1.4 mmol, 0.10 eq.). The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature then a saturated aqueous solution of NaH_2PO_4 (100 mL) was added. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 100 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 70:30) provided **S1** (5.7 g, 99 %) as a light yellow oil. R_f = 0.31 (hexanes/EtOAc, 7:3); **Formula** $C_{20}H_{18}NO_6P$; **MW** 399.3388 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3065, 3038, 2957, 2898, 1589, 1519, 1342, 1213, 1106 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (m, 2H), 7.38 – 7.33 (m, 8H), 7.22 (appd, J = 8.4 Hz, 2H), 5.20 – 5.12 (m, 4H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 155.2 (d, J = 6.6 Hz), 144.7, 134.9, 134.9, 129.0, 128.7, 128.2, 125.5, 120.6, 120.6, 70.6, 70.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+Na]^+$ Calcd for $C_{20}H_{18}NNaO_6P$ 422.0764; Found 422.0760 (-0.87 ppm).

Sodium 4-aminophenyl phosphate (S2)



To a solution of compound **S1** (0.10 g, 0.26 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (1.3 mL, 0.20 M) was added 10 % wt. Pd/C (28 mg, 0.026 mmol, 0.10 eq.). The inert atmosphere was replaced by a positive pressure of H₂, purging 3 times with vacuum. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours under 1 atm of H₂. The resulting mixture was diluted with water and filtered on Celite[®] using water as solvent. The filtrate was concentrated *in vacuo*, taken back in MeOH (2.6 mL, 0.10 M) and NaOH 1M (0.47 mL, 0.47 mmol, 1.8 eq.) and concentrated *in vacuo* again. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, 100% H₂O) provided **S2** (58 mg, 95 %) as a brown solid. **R_f** = 0.08 (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1 + 1 % AcOH); **Formula** C₆H₆NNa₂O₄P; **MW** 233.0703 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3348, 2908, 2575, 1638, 1125, 1074 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, D₂O) δ 6.89 (appd, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.66 (appd, *J* = 8.1 Hz, 2H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, D₂O) δ 147.0 (d, *J* = 6.8 Hz), 140.3, 121.3, 121.2, 117.3 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₆H₆NNa₃O₄P 255.9722; Found 255.9726 (+1.72 ppm).

Sodium 4-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl phosphate (4.50a)

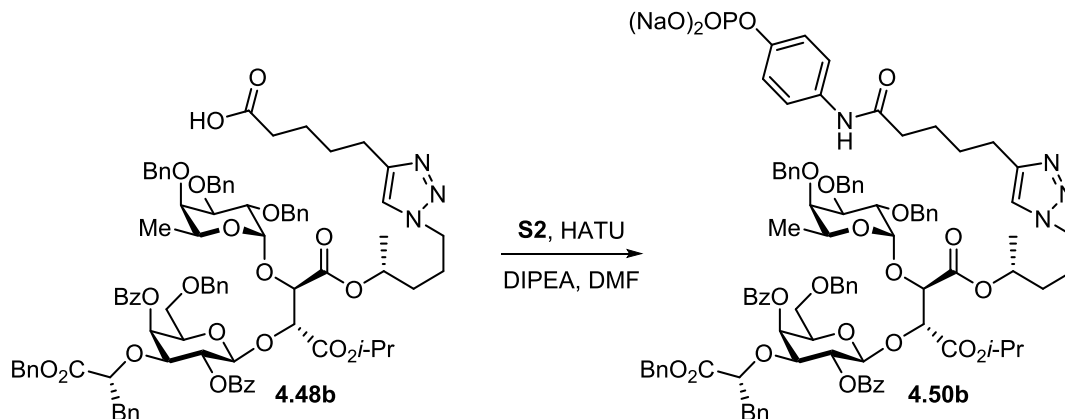


Compound **4.50a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and **S2** (30 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 70:30) provided **4.50a** (91 mg, 80 %) as a clear gum. R_f = 0.17 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -8.3 (*c* 0.76, MeOH); **Formula** C₉₅H₁₀₁N₄Na₂O₂₄P; **MW** 1759.8103 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2919, 2855, 1723, 1508, 1449, 1261, 1100 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.10 – 8.03 (m, 4H), 7.68 (s, 1H), 7.65 – 7.60 (m, 1H), 7.55 – 7.47 (m, 3H), 7.46 – 7.35 (m, 8H), 7.35 – 7.26 (m, 12H), 7.26 – 7.16 (m, 9H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 6.95 – 6.87 (m, 5H), 5.72 (appd, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J* = 9.9, 8.0 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.93 – 4.88 (m, 1H)*, 4.86 – 4.85 (m, 1H)*, 4.84 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.79 – 4.75 (m, 1H), 4.75 – 4.68 (m, 4H), 4.68 – 4.64 (m, 2H), 4.57 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.55 – 4.50 (m, 2H), 4.45 – 4.39 (m, 2H), 4.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.07 (appq, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.96 – 3.91 (m, 2H), 3.89 – 3.83 (m, 2H), 3.66 (appd, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 9.7, 6.2 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J* = 9.7, 6.4 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 13.6, 5.5 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 2.69 – 2.64 (m, 2H), 2.37 – 2.32 (m, 2H), 1.87 – 1.74 (m, 2H), 1.74 – 1.66 (m, 4H), 1.51 – 1.42 (m, 2H), 1.19 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.16 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H), 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 172.5, 170.7, 168.2, 168.1, 165.9, 165.8, 150.0 (d, *J* = 6.9 Hz), 147.4, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.3,

133.2, 132.7, 130.4, 129.8, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.0, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.3, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.0, 121.8, 120.7, 120.1, 120.1, 100.4, 99.4, 78.8, 77.9, 77.7, 77.6, 77.3, 76.9, 75.5, 74.8, 73.2, 72.7, 72.4, 72.1, 71.5, 71.2, 69.3, 67.9, 67.5, 67.0, 66.0, 49.4, 38.8, 36.1, 32.1, 28.7, 25.9, 24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.8, 15.6 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+H+Na]^{2+}$ Calcd for $C_{95}H_{102}N_4Na_3O_{24}P$ 891.3152; Found 891.3135 (-1.90 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 4-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl phosphate (**4.50b**)

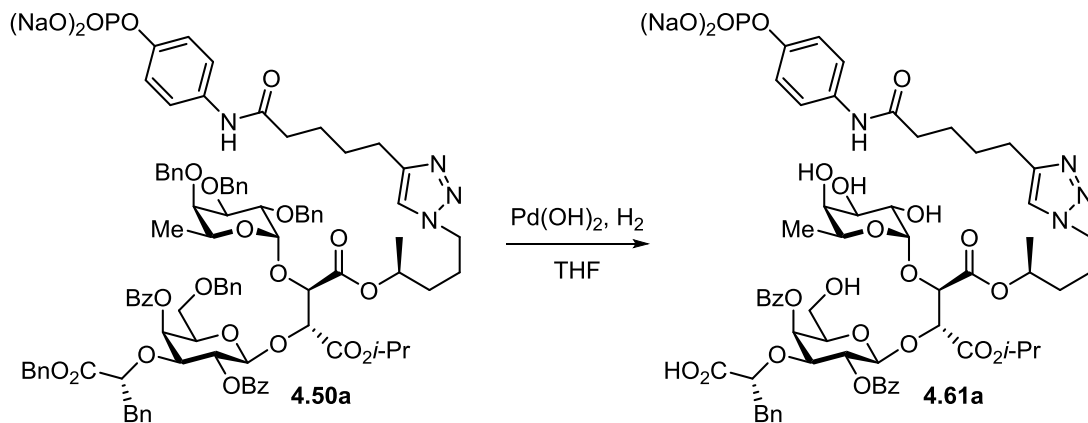


Compound **4.50b** was prepared from **4.48b** (0.15 g, 0.097 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.97 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (51 μ L, 0.29 mmol, 3.0 eq.), HATU (48 mg, 0.13 mmol, 1.3 eq.) and **S2** (45 mg, 0.19 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeCN, 70:30) provided **4.50b** (0.13 g, 76 %) as a clear gum. R_f = 0.14 (EtOAc/*i*-PrOH/ H_2O , 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -13 (*c* 1.5, MeOH); **Formula** $C_{95}H_{101}N_4Na_2O_{24}P$; **MW** 1759.8103 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3029, 2979, 2934, 2865, 1723, 1508, 1449, 1267, 1169, 1100 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.09 (appd, J = 8.2 Hz, 2H), 8.02 (appd, J = 7.7 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.59 (appt, J = 7.5 Hz, 1H), 7.54 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 7.47 – 7.39 (m, 8H), 7.38 – 7.16 (m, 23H), 6.97 (appd, J = 6.3 Hz, 2H), 6.93 – 6.88 (m, 5H), 5.75 (appd, J = 3.2 Hz, 1H), 5.52 – 5.46 (m, 1H), 5.02 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.91 –

4.85 (m, 3H)*, 4.85 – 4.78 (m, 1H), 4.77 – 4.65 (m, 7H), 4.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.54 – 4.48 (m, 3H), 4.42 – 4.36 (m, 3H), 4.19 (appq, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.98 – 3.87 (m, 4H), 3.72 (apps, 1H), 3.62 (dd, $J = 9.5, 5.9$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 9.5, 6.9$ Hz, 1H), 2.83 (dd, $J = 13.6, 5.5$ Hz, 1H), 2.75 – 2.66 (m, 3H), 2.37 – 2.32 (m, 2H), 2.07 – 1.90 (m, 2H), 1.72 – 1.67 (m, 4H), 1.61 – 1.44 (m, 2H), 1.15 – 1.12 (m, 6H), 1.08 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 172.5, 170.8, 168.1, 168.0, 166.1, 165.9, 149.8 (d, $J = 6.3$ Hz), 147.6, 138.8, 138.8, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.5, 133.1, 132.7, 130.5, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.1, 121.9, 120.7, 120.2, 120.1, 100.6, 99.3, 79.0, 77.8, 77.7, 77.6, 77.2, 77.1, 75.6, 74.8, 73.3, 72.8, 72.3, 72.1, 71.3, 71.3, 69.3, 67.7, 67.5, 67.3, 66.0, 49.5, 38.9, 36.1, 32.1, 28.7, 25.8, 25.0, 24.6, 20.7, 20.6, 18.7, 15.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_{24}\text{P}$ 891.3152; Found 891.3148 (-0.47 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 4-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl phosphate (**4.61a**)

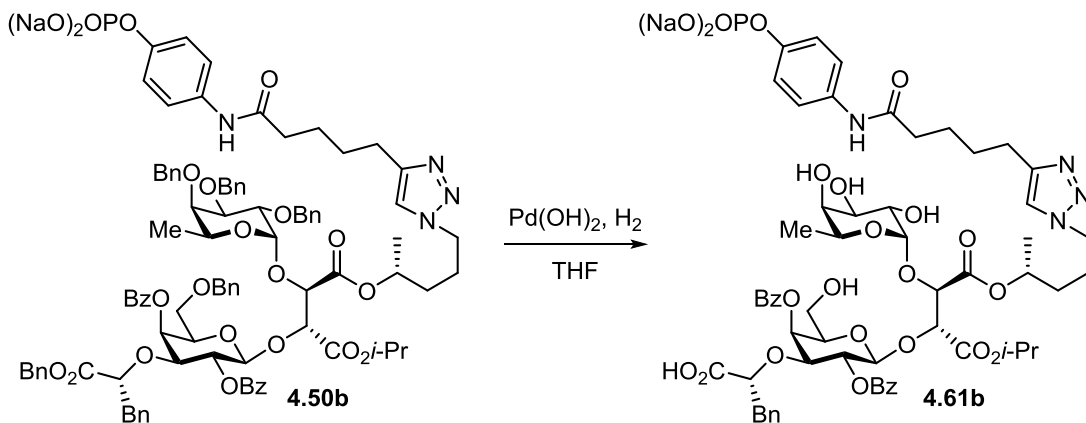


Compound **4.61a** was prepared from **4.50a** (70 mg, 0.040 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (3.3 mL, 0.012 M) and 15 % wt. Pd(OH)₂ (54.0 mg, 0.0577 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 60:40) provided **4.61a** (42 mg, 81 %) as a white solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +11$ (c 0.56, MeOH); **Formula**

$C_{60}H_{71}N_4Na_2O_{24}P$; **MW** 1309.1853 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3392, 2925, 1723, 1508, 1449, 1267, 1089 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.24 – 8.20 (m, 2H), 8.03 – 7.98 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.58 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.52 – 7.47 (m, 4H), 7.44 (appd, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.21 (appd, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.08 (appd, $J = 7.0$ Hz, 2H), 6.83 (appt, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.73 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.81 (appd, $J = 2.9$ Hz, 1H), 5.48 (dd, $J = 10.0, 8.0$ Hz, 1H), 5.08 – 5.02 (m, 1H), 4.91 – 4.89 (m, 1H)*, 4.73 – 4.69 (m, 2H), 4.66 – 4.59 (m, 1H), 4.43 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.30 – 4.22 (m, 4H), 4.06 (appq, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.84 (appt, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J = 10.3, 3.2$ Hz, 1H), 3.64 (dd, $J = 10.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.59 – 3.55 (m, 3H), 2.81 (dd, $J = 13.4, 5.8$ Hz, 1H), 2.75 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.66 (dd, $J = 13.4, 7.2$ Hz, 1H), 2.40 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.84 – 1.73 (m, 6H), 1.52 – 1.37 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.25 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.19 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 176.1, 172.6, 168.7, 167.7, 166.7, 165.6, 149.9, 147.4, 137.6, 133.5, 132.9, 132.5, 130.7, 130.2, 129.7, 129.5, 129.1, 128.1, 127.8, 127.2, 125.4, 121.8, 120.8, 120.2, 120.1, 102.0, 101.7, 78.8, 78.3, 77.5, 75.4, 74.5, 72.1, 71.6, 71.4, 70.1, 69.9, 68.5, 67.3, 66.4, 60.3, 49.4, 39.1, 36.1, 32.2, 28.7, 25.9, 25.0, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+2Na]^{2+}$ Calcd for $C_{60}H_{71}N_4Na_4O_{24}P$ 677.1888; Found 677.1896 (+1.15 ppm).

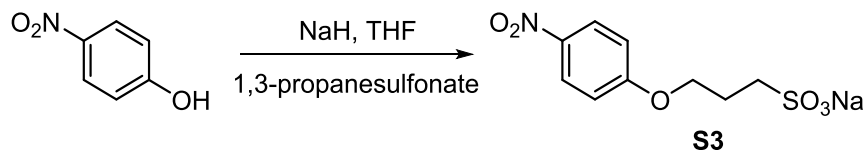
*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 4-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl phosphate (4.61b)



Compound **4.61b** was prepared from **4.50b** (77 mg, 0.044 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B**, using THF (3.6 mL, 0.012 M) and 15 % wt. Pd(OH)₂ (59.5 mg, 0.0635 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeOH, 60:40) provided **4.61b** (51 mg, 91 %) as a white solid. $[\alpha]_D^{25} +4.9$ (*c* 0.76, MeOH); **Formula** C₆₀H₇₁N₄Na₂O₂₄P; **MW** 1309.1853 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3403, 2979, 2936, 1723, 1599, 1508, 1449, 1267, 1089 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.24 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.97 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.64 – 7.56 (m, 2H), 7.52 – 7.43 (m, 6H), 7.21 (appd, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.08 (appd, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.82 (appt, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.72 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.80 (appd, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.47 (dd, *J* = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 5.08 – 5.00 (m, 1H), 4.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.75 – 4.72 (m, 2H), 4.67 – 4.62 (m, 1H), 4.45 – 4.39 (m, 3H), 4.30 (dd, *J* = 10.1, 3.0 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.07 (appq, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.87 (appt, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 10.2, 3.1 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.2, 3.9 Hz, 1H), 3.62 – 3.56 (m, 3H), 2.82 (dd, *J* = 13.4, 5.6 Hz, 1H), 2.77 – 2.72 (m, 2H), 2.69 (dd, *J* = 13.5, 7.2 Hz, 1H), 2.42 – 2.36 (m, 2H), 2.01 – 1.84 (m, 2H), 1.77 – 1.72 (m, 4H), 1.60 – 1.38 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.04 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.01 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 177.0, 172.6, 168.8, 167.9, 167.0, 165.6, 150.4 (d, *J* = 7.1 Hz), 147.4, 138.0, 132.9, 132.9, 132.5, 130.7, 130.2, 129.6, 129.5, 129.1, 128.0, 127.9, 127.1, 125.2, 122.2, 120.7, 120.0, 120.0, 101.9, 101.5, 79.8, 78.1, 77.3, 75.1, 74.7, 72.1, 71.9, 71.5, 70.0, 70.0, 68.3, 67.3, 66.5, 60.5, 49.6, 39.3, 36.1, 32.1, 28.7, 25.9, 25.0, 24.6, 20.6, 20.6, 18.5, 15.1 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+2Na]²⁺ Calcd for C₆₀H₇₁N₄Na₄O₂₄P 677.1888; Found 677.1880 (-1.22 ppm).

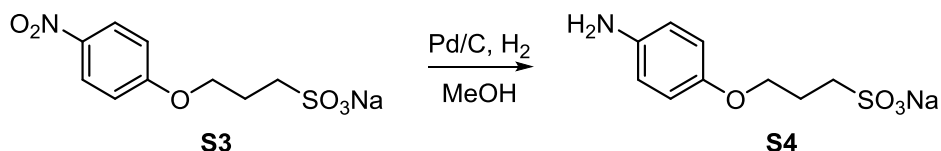
Sodium 3-(4-nitrophenoxy)propane-1-sulfonate (S3)



To a solution of NaH (0.20 g, 5.0 mmol, 1.0 eq.) in THF (7 mL, 0.7 M) cooled to 0°C is added dropwise a solution of 4-Nitrophenol (0.70 g, 5.0 mmol, 1.0 eq.) in THF (2.5 mL, 2.0 M). The reaction mixture was then allowed to warm to room temperature, heated to 40°C for 15 minutes and then cooled to room temperature. A solution of 1,3-propanesulfonate (461 μ L, 5.25 mmol, 1.05 eq.) in THF (2.5 mL, 2.0 M) was added dropwise and the reaction mixture was heated to

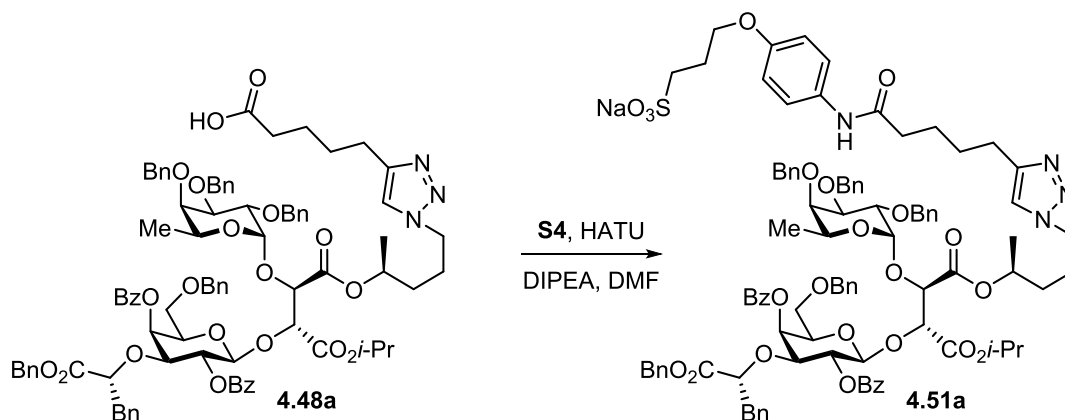
reflux for 4 hours. The reaction mixture was filtrated, and the resulting solid was washed with EtOH and Et₂O. A precipitate was formed in the mother liquor, so it was filtered again and wash with EtOH and Et₂O. The combined solids were dried under vacuum heating at 80°C to afford **S3** (0.48 g, 34 %) as a yellow solid. **R_f** = 0.37 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); **Formula** C₉H₁₀NNaO₆S; **MW** 283.2298 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3457, 2941, 1593, 1510, 1342, 1193, 1052 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, D₂O) δ 8.14 – 8.09 (m, 2H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.01 – 2.96 (m, 2H), 2.18 – 2.10 (m, 2H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, D₂O) δ 164.0, 141.0, 126.1, 114.8, 67.0, 47.6, 24.0 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₉H₁₀NNa₂O₆S 306.0019; Found 306.0022 (+1.11 ppm).

Sodium 3-(4-aminophenoxy)propane-1-sulfonate (**S4**)



To a solution of **S3** (0.42 g, 1.5 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (15 mL, 0.10 M) was added 10 % wt. Pd/C (0.16 g, 0.15 mmol, 0.10 eq.). The inert atmosphere was replaced by a positive pressure of H₂, purging 3 times with vacuum. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 hours under 1 atm of H₂. The resulting mixture was filtered over Celite[®] with MeOH and concentrated *in vacuo* to afford **S4** (0.33 g, 88 %) as a purple grey solid. **R_f** = 0.24 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); **Formula** C₉H₁₂NNaO₄S; **MW** 253.2478 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3392, 2944, 2869, 1515, 1197, 1040 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, D₂O) δ 6.80 – 6.76 (m, 2H), 6.72 – 6.69 (m, 2H), 3.99 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.97 – 2.92 (m, 2H), 2.08 – 2.01 (m, 2H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, D₂O) δ 151.4, 140.1, 117.7, 116.4, 67.6, 47.8, 24.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₉H₁₂NNa₂O₄S 276.0277; Found 276.0278 (+0.40 ppm).

Sodium 3-(4-(5-(1-(((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenoxy)propane-1-sulfonate (4.51a)

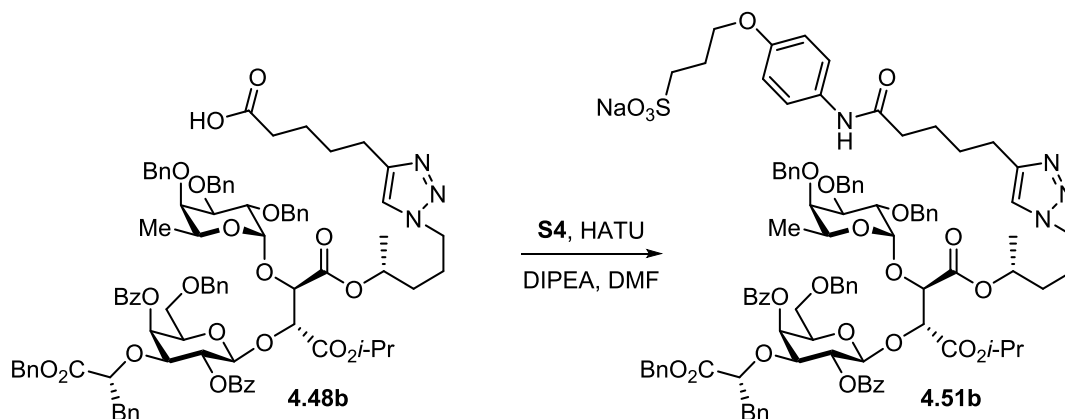


Compound **4.51a** was prepared from **4.48a** (0.14 g, 0.092 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.92 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (48 μ L, 0.28 mmol, 3.0 eq.), HATU (45 mg, 0.12 mmol, 1.3 eq.) and **S4** (47 mg, 0.18 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 70:30) provided **4.51a** (0.14 g, 84 %) as a colorless gum. R_f = 0.48 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -7.8 (c 1.7, MeOH); **Formula** C₉₈H₁₀₇N₄NaO₂₄S; **MW** 1779.9878 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2935, 2867, 1729, 1649, 1513, 1453, 1268, 1175, 1106 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) 8.08 – 8.04 (m, 4H), 7.66 (s, 1H), 7.60 (appt, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 – 7.42 (m, 5H), 7.41 – 7.35 (m, 6H), 7.33 – 7.14 (m, 19H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 6.92 – 6.84 (m, 7H), 5.72 (appd, J = 3.1 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 9.8, 8.2 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.92 – 4.88 (m, 1H)*, 4.85 – 4.82 (m, 2H)*, 4.80 – 4.63 (m, 8H), 4.58 – 4.51 (m, 2H), 4.48 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.38 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.22 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.08 – 4.02 (m, 3H), 3.96 – 3.91 (m, 2H), 3.88 – 3.83 (m, 2H), 3.66 – 3.62 (m, 1H), 3.57 (dd, J = 9.6, 6.2 Hz, 1H), 3.48 (dd, J = 9.7, 6.4 Hz, 1H), 3.01 – 2.96 (m, 2H), 2.81 (dd, J = 13.6, 5.4 Hz, 1H), 2.73 – 2.63 (m, 3H), 2.37 – 2.31 (m, 2H), 2.27 – 2.19 (m, 2H), 1.83 – 1.72 (m, 2H), 1.72 – 1.66 (m, 4H), 1.50 – 1.39 (m, 2H), 1.17 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.14 (appd, J = 6.2 Hz, 6H), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 172.5, 170.7, 168.2, 168.1, 166.0, 165.8, 155.6, 147.4, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.2, 132.7, 131.6, 130.4, 129.8, 129.6, 129.4, 129.2, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0,

127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.2, 126.1, 121.8, 121.5, 114.3, 100.5, 99.5, 78.9, 77.8, 77.7, 77.6, 77.3, 76.9, 75.5, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.0, 71.6, 71.3, 69.3, 67.9, 67.5, 67.0, 66.5, 66.0, 49.4, 48.1, 38.8, 36.1, 32.1, 28.7, 25.9, 25.0, 25.0, 24.6, 20.7, 20.7, 18.9, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 3 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+2H]^{2+}$ Calcd for $C_{98}H_{109}N_4NaO_{24}S$ 890.3519; Found 890.3521 (+0.17 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 3-(4-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenoxy)propane-1-sulfonate (4.51b)

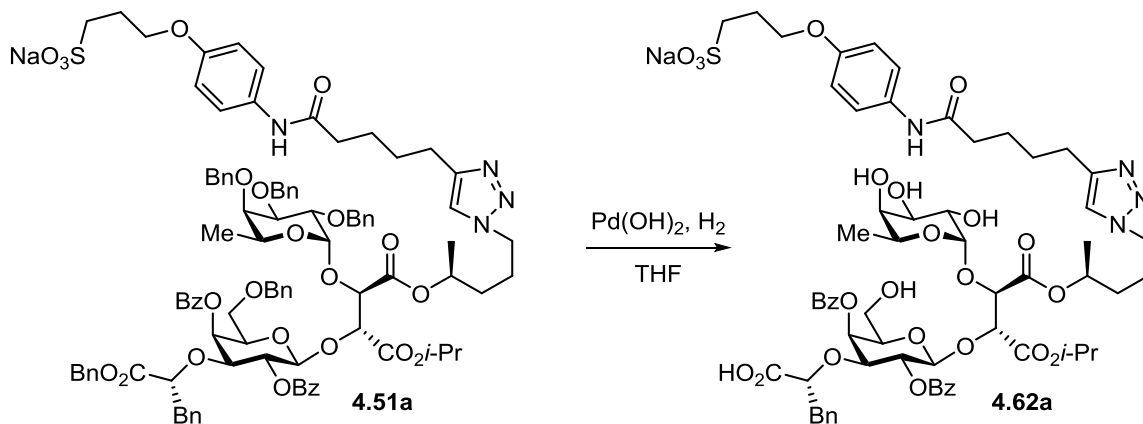


Compound **4.51b** was prepared from **4.48b** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and **S4** (33 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeCN, 80:20) provided **4.51b** (104 mg, 90 %) as a colorless gum. R_f = 0.51 (EtOAc/*i*-PrOH/ H_2O , 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -12 (c 1.8, MeOH); **Formula** $C_{98}H_{107}N_4NaO_{24}S$; **MW** 1779.9878 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3451, 3027, 2979, 2936, 2866, 1723, 1648, 1508, 1449, 1261, 1169, 1100 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) 8.09 (appd, J = 7.7 Hz, 2H), 8.01 (appd, J = 7.7 Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.58 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (appt, J = 7.4 Hz, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 8H), 7.38 – 7.15 (m, 21H), 6.97 – 6.94 (m, 2H), 6.92 – 6.84 (m, 7H), 5.75 (appd, J = 3.2 Hz, 1H), 5.49 (dd, J = 9.7, 8.3 Hz, 1H), 5.01

(d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.90 – 4.85 (m, 3H)*, 4.81 – 4.64 (m, 8H), 4.58 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.52 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.50 – 4.46 (m, 2H), 4.41 – 4.34 (m, 3H), 4.18 (appq, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.97 – 3.93 (m, 2H), 3.92 – 3.87 (m, 2H), 3.70 (apps, 1H), 3.61 (dd, $J = 9.5$, 5.9 Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 9.4$, 6.8 Hz, 1H), 3.02 – 2.97 (m, 2H), 2.82 (dd, $J = 13.7$, 5.5 Hz, 1H), 2.74 – 2.66 (m, 3H), 2.36 – 2.30 (m, 2H), 2.28 – 2.20 (m, 2H), 2.03 – 1.88 (m, 2H), 1.73 – 1.66 (m, 4H), 1.59 – 1.42 (m, 2H), 1.14 – 1.10 (m, 6H), 1.06 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 172.5, 170.8, 168.2, 168.0, 166.1, 165.9, 155.6, 147.6, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.3, 133.2, 132.7, 131.6, 130.5, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.2, 126.1, 122.0, 121.5, 114.3, 100.6, 99.4, 79.0, 77.9, 77.7, 77.6, 77.2, 77.1, 75.6, 74.8, 73.2, 72.9, 72.3, 72.1, 71.4, 71.3, 69.4, 67.7, 67.5, 67.3, 66.5, 66.0, 49.6, 48.1, 38.9, 36.1, 32.1, 28.7, 25.8, 25.0, 25.0, 24.7, 20.7, 20.7, 18.7, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{98}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{24}\text{S}$ 901.3429; Found 901.3417 (-1.39 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 3-(4-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenoxy)propane-1-sulfonate (4.62a)

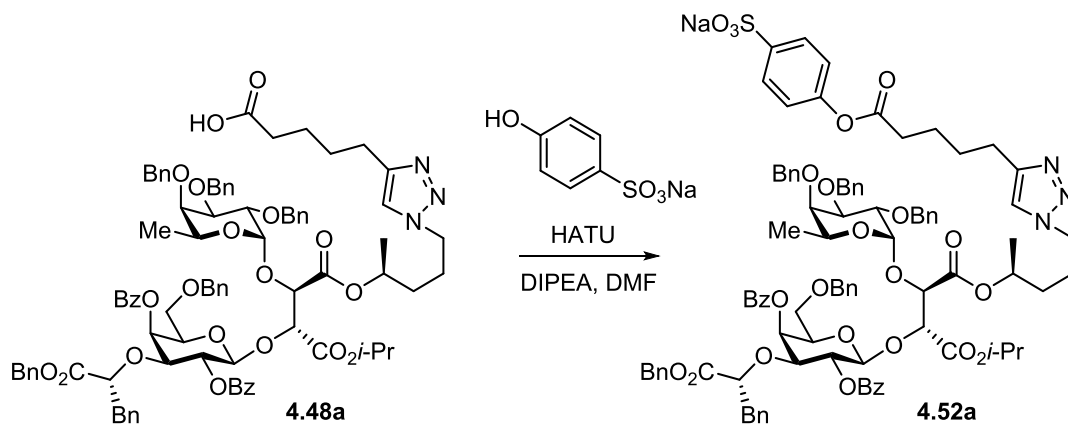


Compound **4.62a** was prepared from **4.51a** (76 mg, 0.043 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (3.5 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (58.0 mg, 0.0619 mmol, 1.45

eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 75:25) provided **4.62a** (51 mg, 90 %) as a white solid. R_f = 0.17 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25}$ +10 (*c* 1.1, MeOH); **Formula** C₆₃H₇₇N₄NaO₂₄S; **MW** 1329.3628 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3408, 2936, 1724, 1599, 1512, 1449, 1272, 1089, 1040 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.19 (appd, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.04 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.65 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.58 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 – 7.42 (m, 6H), 7.07 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.91 – 6.82 (m, 4H), 6.76 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.48 (dd, *J* = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 5.11 – 5.02 (m, 1H), 4.87 – 4.86 (m, 1H)*, 4.74 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.66 – 4.60 (m, 1H), 4.46 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.30 – 4.22 (m, 3H), 4.12 – 4.02 (m, 3H), 3.86 (appt, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 10.3, 3.2 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 10.2, 4.0 Hz, 1H), 3.61 – 3.57 (m, 3H), 2.99 (dd, *J* = 8.7, 6.7 Hz, 2H), 2.84 – 2.67 (m, 4H), 2.42 – 2.37 (m, 2H), 2.28 – 2.21 (m, 2H), 1.84 – 1.71 (m, 6H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.26 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 175.9, 172.6, 168.8, 167.7, 166.8, 165.6, 155.7, 147.4, 137.5, 133.0, 132.5, 131.5, 130.6, 130.2, 129.7, 129.5, 129.1, 128.1, 127.8, 127.2, 125.4, 121.8, 121.6, 114.3, 102.0, 101.7, 78.9, 78.3, 77.4, 75.4, 74.5, 72.1, 71.7, 71.4, 70.1, 70.0, 68.4, 67.4, 66.5, 66.4, 60.3, 49.4, 48.0, 39.1, 36.0, 32.2, 28.7, 25.9, 25.0, 25.0, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+2Na]²⁺ Calcd for C₆₃H₇₇N₄Na₃O₂₄S 687.2166; Found 687.2175 (+1.48 ppm).

*Hidden under H₂O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

Sodium 4-((5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoyl)oxy)benzenesulfonate (4.52a)



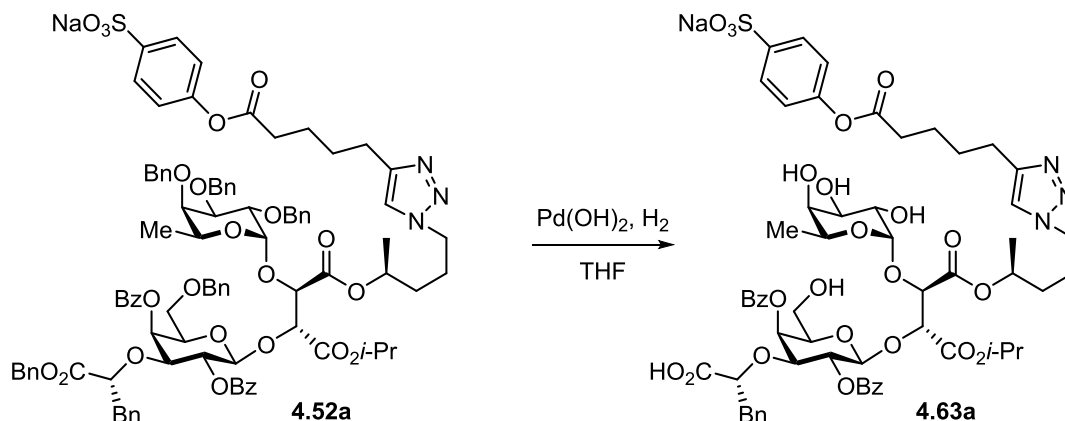
Compound **4.52a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and sodium 4-hydroxybenzenesulfonate (25 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 20:80) provided **4.52a** (0.10 g, 92 %) as a white solid. R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ –6.8 (*c* 1.2, MeOH); **Formula** C₉₅H₁₀₀N₃NaO₂₄S; **MW** 1722.8918 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2979, 1728, 1449, 1267, 1197, 1100 cm^{–1}; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.07 (appd, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.88 (appd, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.60 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.53 – 7.44 (m, 3H), 7.42 – 7.35 (m, 6H), 7.33 – 7.15 (m, 19H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.01 – 6.96 (m, 2H), 6.94 – 6.85 (m, 5H), 5.72 (appd, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.51 (dd, *J* = 9.5, 8.5 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.93 – 4.88 (m, 1H), 4.88 – 4.86 (m, 1H)*, 4.83 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.81 – 4.64 (m, 8H), 4.59 – 4.46 (m, 3H), 4.44 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.07 (appq, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.98 – 3.91 (m, 2H), 3.90 – 3.84 (m, 2H), 3.66 (apps, 1H), 3.57 (dd, *J* = 9.4, 6.3 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 16.4, 7.0 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 13.5, 5.2 Hz, 1H), 2.74 – 2.63 (m, 3H), 2.59 – 2.51 (m, 2H), 1.83 – 1.73 (m, 2H), 1.73 – 1.67 (m, 4H), 1.49 – 1.39 (m, 2H), 1.20 – 1.12 (m, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 171.7, 170.7, 168.2, 168.1, 166.0, 165.8, 152.1, 147.4, 142.6, 138.9, 138.8, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.2, 132.7, 130.4, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9,

127.8, 127.7, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6, 127.4, 127.4, 127.3, 127.2, 127.2, 127.1, 126.1, 121.9, 121.2, 100.5, 99.5, 78.9, 77.9, 77.7, 77.7**, 77.3, 76.9, 75.5, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.1, 71.6, 71.3, 69.3, 67.9, 67.5, 67.1, 66.0 49.4, 38.8, 33.2, 32.1, 28.4, 25.9, 24.6, 23.9, 20.7, 20.7, 18.9, 15.7 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+2H]^{2+}$ Calcd for $C_{95}H_{102}N_3NaO_{24}S$ 861.8231; Found 861.8218 (-1.38 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

**This carbon does not appear clearly on the ^{13}C NMR, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

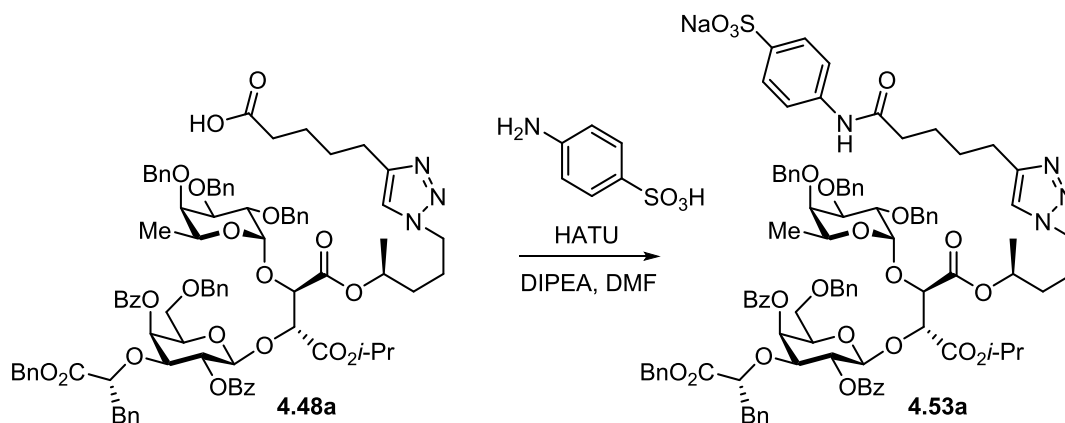
Sodium 4-((5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoyl)oxy)benzenesulfonate (4.63a)



Compound **4.63a** was prepared from **4.52a** (0.13 g, 0.078 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (6.5 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $Pd(OH)_2$ (106 mg, 0.113 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeCN, 70:30) provided **4.63a** (66 mg, 67 %) as a white solid. R_f = 0.24 (EtOAc/*i*-PrOH/ H_2O , 6:3:1); $[\alpha]_D^{25} +10$ (*c* 1.1, MeOH); **Formula** $C_{60}H_{70}N_3NaO_{24}S$; **MW** 1272.2668 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3424, 2931, 1725, 1594, 1452, 1271, 1201, 1127, 1080 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.21 (appd, J = 7.3 Hz, 2H), 8.03 (appd, J = 7.4 Hz, 2H), 7.88 (appd, J = 8.5 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.65 (appt, J = 7.0 Hz, 1H), 7.59 (appt, J = 7.1 Hz, 1H), 7.52 – 7.47 (m, 4H), 7.17 (appd, J = 8.3 Hz, 2H), 7.08 (appd, J = 7.1 Hz, 2H), 6.86 (appt, J = 7.2 Hz, 2H), 6.77 (appt, J = 7.1 Hz, 1H),

5.82 (apps, 1H), 5.49 – 5.43 (m, 1H), 5.11 – 5.03 (m, 1H), 4.86 – 4.84 (m, 1H)*, 4.77 – 4.73 (m, 1H), 4.73 – 4.69 (m, 1H), 4.67 – 4.57 (m, 1H), 4.49 – 4.44 (m, 1H), 4.32 – 4.23 (m, 4H), 4.07 – 4.01 (m, 1H), 3.89 – 3.84 (m, 1H), 3.79 – 3.74 (m, 1H), 3.71 – 3.65 (m, 1H), 3.63 – 3.55 (m, 3H), 2.85 – 2.74 (m, 3H), 2.74 – 2.62 (m, 3H), 1.84 – 1.76 (m, 6H), 1.52 – 1.37 (m, 2H), 1.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 176.3, 171.8, 168.9, 167.6, 167.0, 165.7, 152.1, 147.3, 142.5, 137.7, 133.0, 132.6, 130.5, 130.3, 129.7, 129.5, 129.1, 128.1, 127.8, 127.2, 127.0, 125.4, 121.9, 121.2, 102.0, 101.6, 79.3, 78.1, 77.2, 75.3, 74.6, 72.0, 71.8, 71.6, 70.1, 70.0, 68.3, 67.4, 66.5, 60.3, 49.4, 39.2, 33.2, 32.2, 28.4, 25.9, 24.5, 23.9, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{Na}_3\text{O}_{24}\text{S}$ 658.6876; Found 658.6868 (-1.19 ppm).
 *Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra.

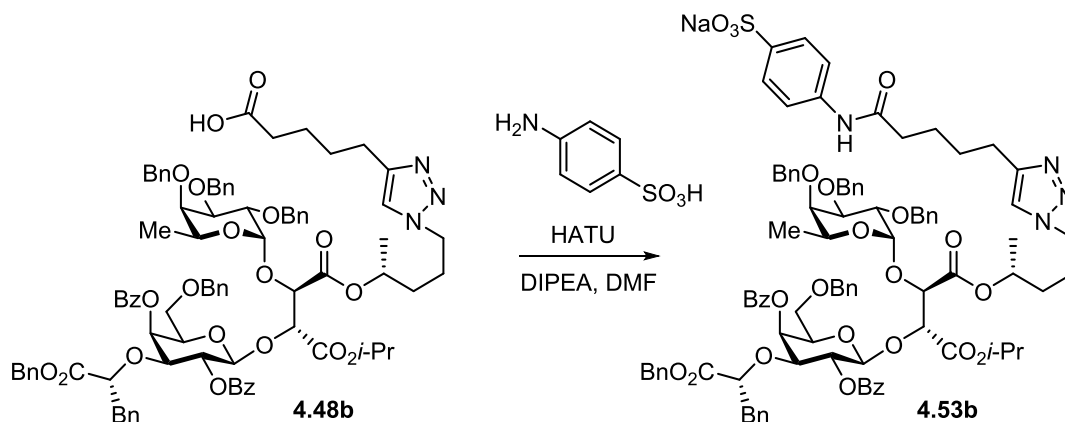
Sodium 4-(5-(1-(((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)benzenesulfonate (**4.53a**)



Compound **4.53a** was prepared from **4.48a** (0.20 g, 0.13 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure A, using DMF (1.3 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (68 μL , 0.39 mmol, 3.0 eq.), HATU (64 mg, 0.17 mmol, 1.3 eq.) and 4-aminobenzenesulfonic acid (27 mg, 0.16 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 30:70) provided **4.53a** (0.11 g, 47 %) as a white solid. $R_f = 0.23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -9.8$ (c 1.2, MeOH); **Formula** $\text{C}_{95}\text{H}_{101}\text{N}_4\text{NaO}_{23}\text{S}$; **MW** 1721.9078 g/mol; **IR** (neat)

ν_{max} 3435, 2936, 1727, 1596, 1496, 1453, 1267, 1176, 1106 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (appd, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.79 (appd, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.68 – 7.63 (m, 3H), 7.60 (appt, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.53 – 7.44 (m, 3H), 7.41 – 7.35 (m, 6H), 7.34 – 7.14 (m, 19H), 7.00 – 6.96 (m, 2H), 6.93 – 6.86 (m, 5H), 5.73 (appd, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.51 (dd, $J = 9.8, 8.2$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.93 – 4.87 (m, 1H), 4.85 – 4.83 (m, 2H), 4.81 – 4.63 (m, 8H), 4.59 – 4.52 (m, 2H), 4.49 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.06 (appq, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.98 – 3.92 (m, 2H), 3.89 – 3.84 (m, 2H), 3.65 (appd, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 9.6, 6.2$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 9.7, 6.4$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 13.6, 5.5$ Hz, 1H), 2.74 – 2.62 (m, 3H), 2.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.85 – 1.72 (m, 2H), 1.72 – 1.66 (m, 4H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 1.17 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.14 (appd, $J = 6.2$ Hz, 6H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 172.9, 170.7, 168.2, 168.1, 166.0, 165.8, 147.4, 140.4, 140.1, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 133.2, 132.7, 130.4, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.1, 128., 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.2, 126.4, 126.1, 121.8, 118.7, 100.5, 99.5, 78.9, 77.8, 77.7, 77.6, 77.3, 76.9, 75.5, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.1, 71.6, 71.3, 69.3, 67.9, 67.5, 67.0, 66.0, 49.4, 38.8, 36.2, 32.1, 28.6, 25.9, 24.8, 24.6, 20.7, 20.7, 18.9, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 1 peak is missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{103}\text{N}_4\text{NaO}_{21}$ 861.3311; Found 861.3299 (-1.35 ppm).

Sodium 4-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)benzenesulfonate (4.53b)

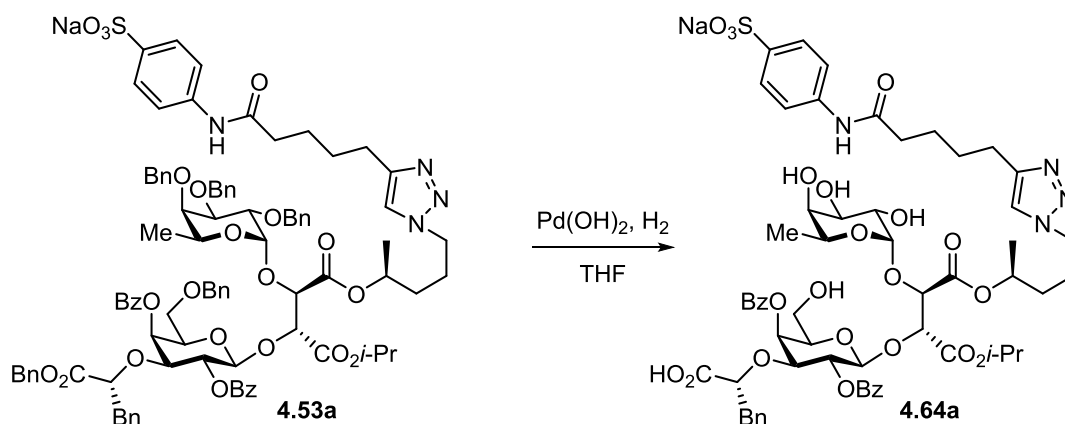


Compound **4.53b** was prepared from **4.48b** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and 4-aminobenzenesulfonic acid (22 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 30:70) provided **4.53b** (76 mg, 69 %) as a white solid. R_f = 0.14 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ –12 (*c* 1.4, MeOH); **Formula** C₉₅H₁₀₁N₄NaO₂₃S; **MW** 1721.9078 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3463, 3031, 2979, 2934, 2866, 1728, 1599, 1498, 1453, 1267, 1175, 1100 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 9.87 (s, 1H), 8.12 – 8.08 (m, 2H), 8.04 – 8.00 (m, 2H), 7.82 – 7.76 (m, 3H), 7.67 – 7.63 (m, 2H), 7.58 (appt, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.45 – 7.14 (m, 27H), 6.97 – 6.94 (m, 2H), 6.93 – 6.87 (m, 5H), 5.75 (appd, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.49 (dd, *J* = 9.9, 8.1 Hz, 1H), 5.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.93 – 4.85 (m, 3H)*, 4.83 – 4.63 (m, 8H), 4.59 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.51 – 4.47 (m, 2H), 4.42 – 4.35 (m, 3H), 4.18 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.99 – 3.94 (m, 2H), 3.92 – 3.87 (m, 2H), 3.71 (apps, 1H), 3.61 (dd, *J* = 9.5, 5.9 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 13.6, 5.5 Hz, 1H), 2.75 – 2.65 (m, 3H), 2.42 – 2.34 (m, 2H), 2.06 – 1.86 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 4H), 1.60 – 1.42 (m, 2H), 1.15 – 1.11 (m, 6H), 1.07 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 172.9, 170.8, 168.2, 168.0, 166.1, 165.9, 147.5, 140.4, 140.1, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.3, 133.2, 132.7, 130.5, 129.9, 129.5, 129.5, 129.2, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9,

127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.4, 126.1, 122.0, 118.7, 100.6, 99.3, 79.0, 77.8, 77.7, 77.6, 77.2, 77.1, 75.6, 74.8, 73.2, 72.9, 72.3, 72.1, 71.4, 71.3, 69.4, 67.7, 67.5, 67.3, 66.0, 49.5, 38.9, 36.2, 32.1, 28.7, 25.8, 24.8, 24.7, 20.7, 20.6, 18.7, 15.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 1 peak is missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+H+Na]^{2+}$ Calcd for $C_{95}H_{102}N_4Na_2O_{23}S$ 872.3220; Found 872.3217 (-0.29 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

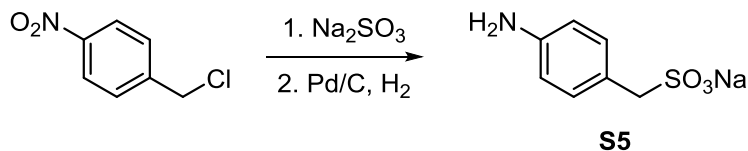
Sodium 4-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)benzenesulfonate (**4.64a**)



Compound **4.64a** was prepared from **4.53a** (0.10 g, 0.061 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (5.1 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $Pd(OH)_2$ (82.8 mg, 0.0884 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeOH, 65:35) provided **4.64a** (30 mg, 39 %) as a white solid. R_f = 0.17 (EtOAc/*i*-PrOH/ H_2O , 6:3:1); $[\alpha]_D^{25} +10$ (c 1.7, MeOH); **Formula** $C_{60}H_{71}N_4NaO_{23}S$; **MW** 1271.2828 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3435, 2936, 1723, 1594, 1444, 1389, 1267, 1030 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.22 (appd, J = 7.9 Hz, 2H), 8.03 – 8.00 (m, 2H), 7.78 (appd, J = 8.8 Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 3H), 7.59 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.51 – 7.47 (m, 4H), 7.09 (appd, J = 7.3 Hz, 2H), 6.85 (appt, J = 7.6 Hz, 2H), 6.75 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, J = 3.0 Hz, 1H), 5.46 (dd, J = 9.6, 8.3 Hz, 1H), 5.10 – 5.03 (m, 1H), 4.86 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.66 – 4.58 (m, 1H), 4.45 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.29 – 4.22 (m, 4H), 4.04 (appq, J = 6.5 Hz, 1H),

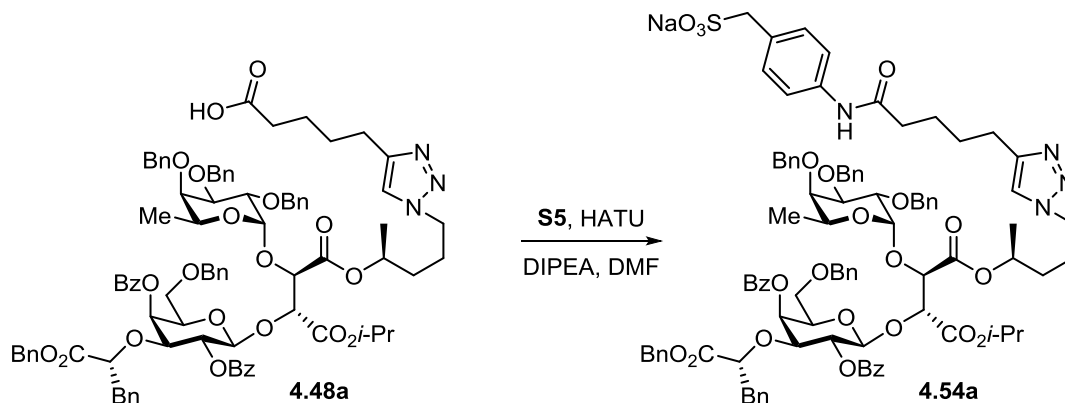
3.85 (appt, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 10.3, 3.9$ Hz, 1H), 3.57 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 2.82 (dd, $J = 13.4, 5.8$ Hz, 1H), 2.74 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.67 (dd, $J = 13.4, 7.2$ Hz, 1H), 2.44 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.85 – 1.72 (m, 6H), 1.52 – 1.37 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 177.1, 173.0, 168.9, 167.6, 167.0, 165.6, 147.4, 140.4, 140.1, 138.0, 132.9, 132.5, 130.6, 130.3, 129.7, 129.6, 129.1, 128.0, 127.8, 127.2, 126.3, 125.3, 121.8, 118.7, 102.0, 101.6, 79.8, 78.1, 77.3, 75.1, 74.7, 72.0, 71.8, 71.6, 70.1, 68.3, 67.4, 66.5, 60.4, 49.4, 39.3, 36.2, 32.2, 28.7, 25.9, 24.8, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{NaO}_{23}\text{S}$ 1271.4200; Found 1271.4199 (-0.09 ppm).

Sodium (4-aminophenyl)methanesulfonate (**S5**)



To a solution of 4-Nitrobenzyl chloride (0.50 g, 2.9 mmol, 1.0 eq.) in water (1.5 mL, 2.0 M) was added Na_2SO_3 (0.37 g, 2.9 mmol, 1.0 eq.) The reaction mixture was stirred at reflux for 16 hours, then cooled to room temperature. The precipitate was filtered, washed with Et_2O and dried in the oven. To the resulting solid was added water (7 mL, 0.4 M) and 10 % wt. Pd/C (71 mg, 0.067 mmol, 0.023 eq). The inert atmosphere was replaced by a positive pressure of H_2 , purging 3 times with vacuum. The reaction mixture was stirred at room temperature for 22 hours under 1 atm of H_2 . The resulting mixture was filtered on Celite[®] and concentrated *in vacuo* to afford **S5** (0.50 g, 82 %) as a beige solid. NMR spectroscopic data correlate with the previously reported data for **S5**.¹⁰ ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.12 – 7.09 (m, 2H), 6.74 – 6.71 (m, 2H), 3.95 (s, 2H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ 145.9, 131.2, 122.3, 116.3, 56.2 ppm.

Sodium (4-(5-(1-(((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl)methanesulfonate (4.54a)

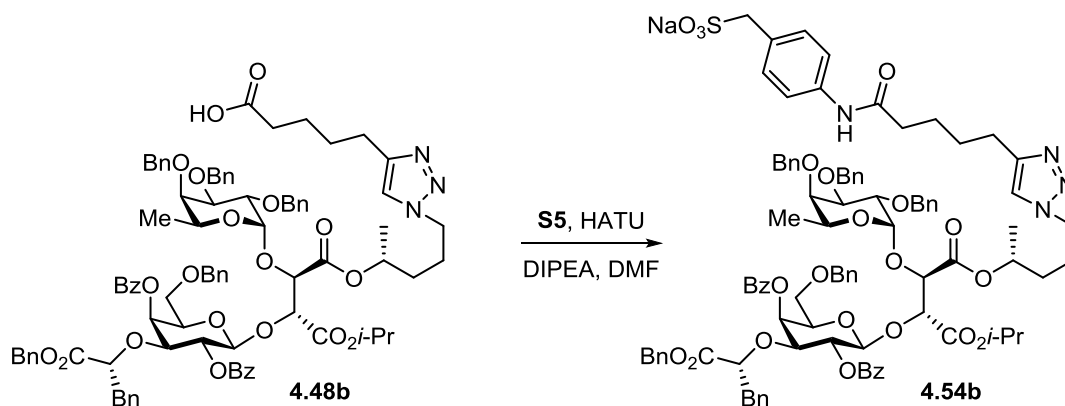


Compound **4.54a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and **S5** (27 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 20:80) provided **4.54a** (91 mg, 81 %) as a white solid. R_f = 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ –6.6 (*c* 1.5, MeOH); **Formula** C₉₆H₁₀₃N₄NaO₂₃S; **MW** 1735.9348 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3435, 2930, 2866, 1723, 1653, 1515, 1453, 1268, 1106 cm^{–1}; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.10 – 8.04 (m, 4H), 7.68 (s, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.55 – 7.43 (m, 5H), 7.42 – 7.35 (m, 8H), 7.33 – 7.15 (m, 19H), 6.99 (appd, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.93 – 6.86 (m, 5H), 5.72 (appd, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.53 – 5.47 (m, 1H), 5.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.94 – 4.90 (m, 1H)*, 4.87 – 4.82 (m, 2H), 4.81 – 4.63 (m, 8H), 4.58 – 4.47 (m, 3H), 4.44 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.39 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.06 (appq, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.96 – 3.92 (m, 2H), 3.89 – 3.83 (m, 2H), 3.65 (apps, 1H), 3.57 (dd, *J* = 9.5, 6.3 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 13.6, 5.4 Hz, 1H), 2.74 – 2.63 (m, 3H), 2.39 – 2.33 (m, 2H), 1.84 – 1.72 (m, 2H), 1.73 – 1.64 (m, 4H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.20 – 1.13 (m, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 172.7, 170.7, 168.2, 168.1, 166.0, 165.8, 147.4, 138.9, 138.7, 138.7, 137.8, 137.7, 135.5, 135.4, 133.2, 132.8, 130.6, 130.4, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.8, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.2, 126.1, 121.9,

119.4, 100.5, 99.5, 78.9, 77.8, 77.7, 77.6, 77.3, 76.9, 75.5, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.0, 71.6, 71.3, 69.3, 67.9, 67.5, 67.0, 66.0, 56.6, 49.4, 38.8, 36.2, 32.1, 28.7, 25.9, 24.9, 24.6, 20.7 20.7, 18.9, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[M+H+Na]^{2+}$ Calcd for $C_{96}H_{104}N_4Na_2O_{23}S$ 879.3298; Found 879.3290 (-0.67 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

Sodium (4-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl)methanesulfonate (4.54b)

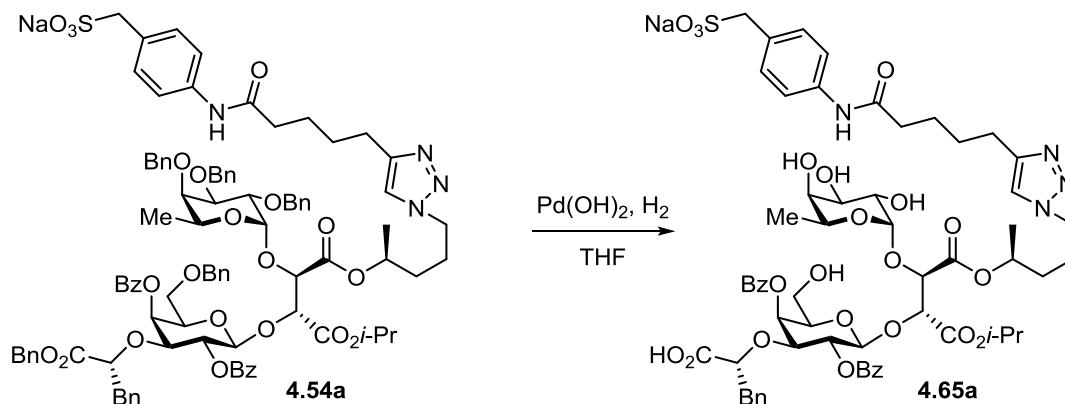


Compound **4.54b** was prepared from **4.48b** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μ L, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and **S5** (27 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H_2O :MeCN, 30:70) provided **4.54b** (94 mg, 84 %) as a white solid. R_f = 0.33 (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ -13 (c 1.9, MeOH); **Formula** $C_{96}H_{103}N_4NaO_{23}S$; **MW** 1735.9348 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3424, 2979, 2932, 2863, 1725, 1515, 1453, 1267, 1175, 1105, 1045 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.09 (appd, J = 7.3 Hz, 2H), 8.02 (appd, J = 7.2 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.60 – 7.50 (m, 4H), 7.47 – 7.14 (m, 29H), 6.97 – 6.64 (m, 2H), 6.94 – 6.87 (m, 5H), 5.75 (appd, J = 2.0 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 9.7, 8.3 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.91 – 4.85 (m, 3H)*, 4.82 – 4.64 (m, 8H), 4.58 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.53 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 4.50 – 4.46 (m, 2H), 4.41 – 4.33 (m, 3H), 4.17 (appq, J

= 5.8 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.99 – 3.93 (m, 2H), 3.92 – 3.87 (m, 2H), 3.70 (apps, 1H), 3.61 (dd, $J = 9.4, 6.0$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 9.3, 7.0$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J = 13.6, 5.4$ Hz, 1H), 2.75 – 2.64 (m, 3H), 2.35 (apps, 2H), 2.05 – 1.86 (m, 2H), 1.69 (apps, 4H), 1.50 (dd, $J = 42.8, 6.2$ Hz, 2H), 1.14 – 1.10 (m, 6H), 1.06 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 172.7, 170.8, 168.2, 168.0, 166.1, 165.9, 147.5, 138.8, 138.7, 138.7, 137.8, 137.7, 135.5, 135.3, 133.2, 132.7, 130.6, 130.4, 129.9, 129.5, 129.5, 129.2, 128.8, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.1, 121.9, 119.4, 100.6, 99.3, 79.0, 77.8, 77.7, 77.6, 77.2, 77.1, 75.6, 74.8, 73.2, 72.9, 72.3, 72.1, 71.4, 71.3, 69.4, 67.7, 67.5, 67.3, 66.0, 56.6, 49.5, 38.9, 36.2, 32.1, 28.7, 25.8, 24.9, 24.7, 20.7, 20.7, 18.7, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 2 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{96}\text{H}_{104}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_{23}\text{S}$ 879.3298; Found 879.3299 (+0.10 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

Sodium (4-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)phenyl)methanesulfonate (4.65a)



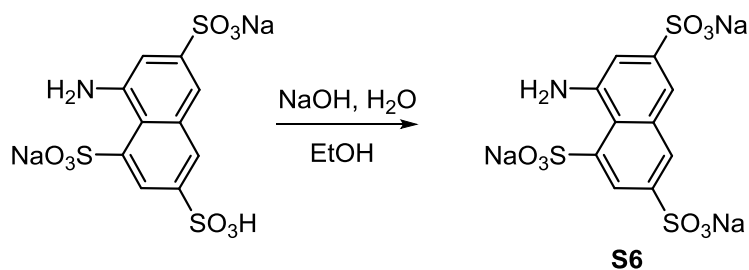
Compound **4.65a** was prepared from **4.54a** (91 mg, 0.052 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (4.4 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (71.2 mg, 0.0760 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 60:40) provided **4.65a** (38 mg, 56 %) as a white solid. $R_f = 0.16$ ($\text{EtOAc}/i\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$, 6:3:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$

+6.1 (*c* 1.1, MeOH); **Formula** C₆₁H₇₃N₄NaO₂₃S; **MW** 1285.3098 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3414, 2931, 1725, 1599, 1515, 1451, 1269, 1085, 1040 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.16 (appd, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.07 – 8.04 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.66 (appt, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.55 – 7.44 (m, 6H), 7.38 (appd, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.06 (appd, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.86 (appt, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.78 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.49 (dd, *J* = 9.9, 8.0 Hz, 1H), 5.10 – 5.01 (m, 1H)*, 4.88 – 4.87 (m, 1H), 4.76 – 4.71 (m, 2H), 4.67 – 4.59 (m, 1H), 4.47 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.38 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.29 – 4.20 (m, 3H), 4.09 – 4.01 (m, 3H), 3.87 (appt, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 10.3, 3.2 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 10.3, 4.0 Hz, 1H), 3.62 – 3.55 (m, 3H), 2.82 – 2.71 (m, 4H), 2.45 – 2.39 (m, 2H), 1.84 – 1.72 (m, 6H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 1.30 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.26 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 175.0, 172.8, 168.7, 167.7, 166.6, 165.7, 147.4, 137.7, 137.0, 133.0, 132.5, 130.6, 130.5, 130.1, 129.6, 129.5, 129.1, 128.8, 128.1, 127.8, 127.3, 125.5, 121.9, 119.4, 101.9, 101.7, 78.4, 77.9**, 77.4, 75.7, 74.4, 72.1, 71.7, 71.3, 70.0, 69.9, 68.4, 67.3, 66.4, 60.2, 56.5, 49.4, 39.0, 36.2, 32.2, 28.6, 25.9, 24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+2Na]²⁺ Calcd for C₆₁H₇₃N₄Na₃O₂₃S 665.2034; Found 665.2029 (-0.74 ppm).

*Hidden under H₂O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

**This carbon does not appear on the ¹³C NMR, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

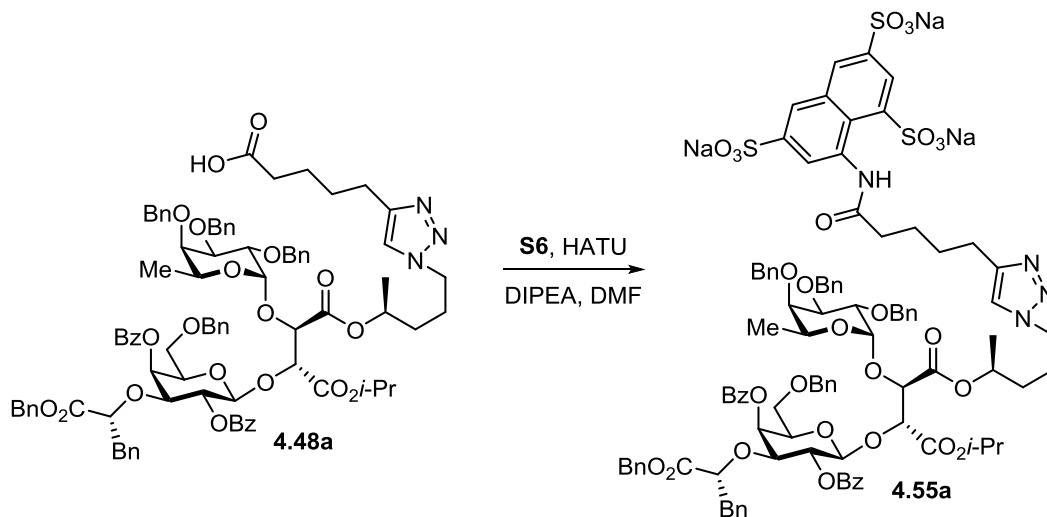
Sodium 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate (S6)



To a solution of 5M NaOH (2.1 mL, 10 mmol, 1.1 eq.) in water (7.8 mL, 1.2 M) was added disodium 8-amino-1,3,6-naphthalenetrisulfonate hydrate (4.0 g, 9.4 mmol, 1.0 eq.). The reaction mixture was heated at 70°C for 2 hours before filtration. EtOH was slowly added to the filtrate, then the resulting mixture was stirred and allowed to cool to room temperature. The precipitate

was filtrated and washed successively with EtOH and Et₂O. The solids were dried under vacuum to afford **S6** as a yellow powder in quantitative yields. **Formula** C₁₀H₆NNa₃O₉S₃; **MW** 449.3053 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3420, 2962, 1637, 1186, 1018, 791 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.36 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.88 (s, 2H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, (CD₃)₂SO) δ 146.3, 145.9, 143.5, 143.2, 135.7, 127.9, 124.3, 118.4, 113.1, 109.5 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : [M+Na]⁺ Calcd for C₁₀H₆NNa₄O₉S₃ 471.8790; Found 471.8790 (+0.11 ppm).

Sodium 8-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)naphthalene-1,3,6-trisulfonate (**4.55a**)

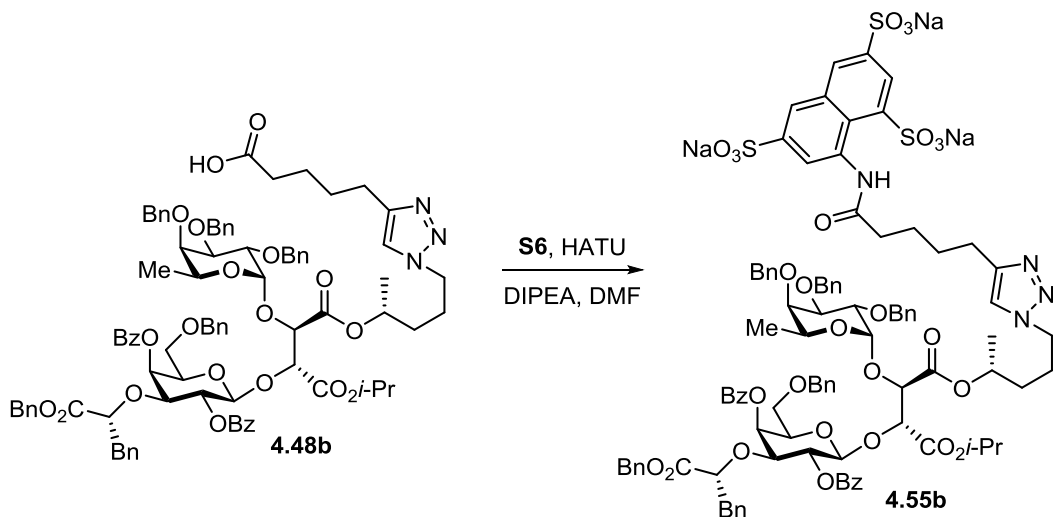


Compound **4.55a** was prepared from **4.48a** (0.12 g, 0.078 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A** (reaction mixture stirred at 55°C), using DMF (0.78 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (41 μ L, 0.23 mmol, 3.0 eq.), HATU (38 mg, 0.10 mmol, 1.3 eq.) and **S6** (70 mg, 0.16 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 50:50) provided **4.55a** (0.13 g, 83 %) as a white solid. **R_f** = 0.06 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); [α]_D²⁵ -6.0 (*c* 1.8, MeOH); **Formula** C₉₉H₁₀₁N₄Na₃O₂₉S₃; **MW** 1976.0453 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3462, 2936, 1728, 1648, 1496, 1453, 1269, 1212, 1107, 1049 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 11.66 (s, 1H), 9.00 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.58

(d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.11 – 8.05 (m, 4H), 7.78 (s, 1H), 7.62 (appt, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.55 – 7.47 (m, 3H), 7.43 – 7.36 (m, 6H), 7.34 – 7.16 (m, 19H), 7.02 – 6.97 (m, 2H), 6.95 – 6.86 (m, 5H), 5.74 (appd, $J = 3.1$ Hz, 1H), 5.49 (dd, $J = 9.9$, 8.1 Hz, 1H), 4.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.93 – 4.88 (m, 1H), 4.88 – 4.87 (m, 1H)*, 4.85 – 4.84 (m, 1H)*, 4.80 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.77 – 4.66 (m, 7H), 4.60 – 4.49 (m, 3H), 4.45 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.05 (appq, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.99 – 3.93 (m, 2H), 3.91 – 3.84 (m, 2H), 3.68 (appd, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.58 (dd, $J = 9.7$, 6.2 Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 9.7$, 6.4 Hz, 1H), 2.83 (dd, $J = 13.6$, 5.5 Hz, 1H), 2.76 – 2.69 (m, 3H), 2.61 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.88 – 1.73 (m, 6H), 1.53 – 1.39 (m, 2H), 1.19 – 1.14 (m, 9H), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.3, 170.8, 168.3, 168.1, 166.1, 165.8, 147.7, 142.9, 141.4, 140.7, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 134.9, 133.2, 132.8, 130.3, 130.0, 129.8, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.9, 126.0, 123.9, 123.9, 122.5, 122.1, 100.6, 99.4, 78.8, 77.7, 77.6, 77.6, 77.4, 76.9, 75.4, 74.8, 73.2, 72.8, 72.4, 72.0, 71.7, 71.3, 69.4, 67.8, 67.5, 67.1, 66.0, 49.4, 38.8, 36.3, 32.1, 28.6, 25.9, 24.6, 24.5, 20.6, 20.6, 18.8, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 5 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{99}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{29}\text{S}_3$ 999.2686; Found 999.2686 (-0.14 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

Sodium 8-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)naphthalene-1,3,6-trisulfonate (**4.55b**)

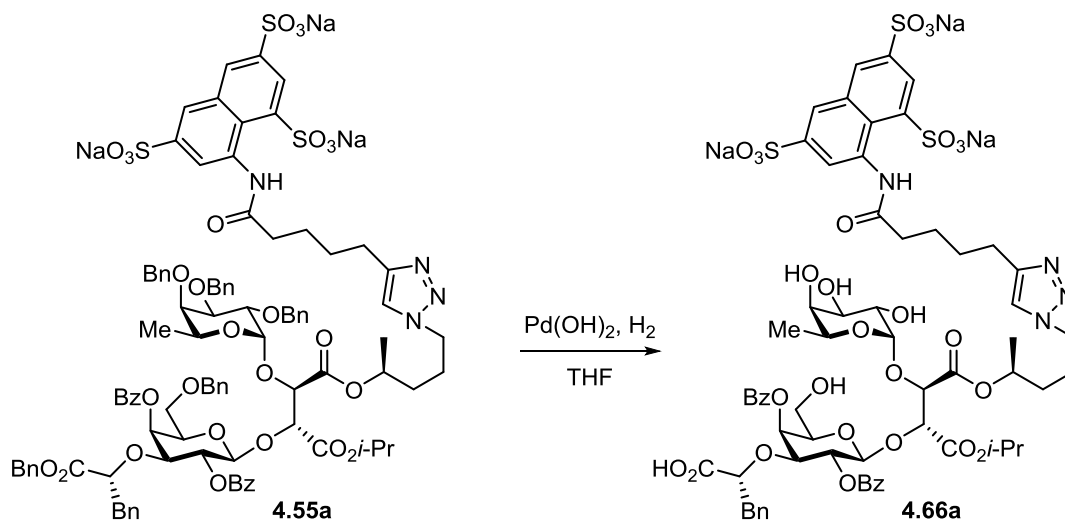


Compound **4.55b** was prepared from **4.48b** (0.12 g, 0.078 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A** (reaction mixture stirred at 55°C), using DMF (0.78 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (41 μ L, 0.23 mmol, 3.0 eq.), HATU (38 mg, 0.10 mmol, 1.3 eq.) and **S6** (70 mg, 0.16 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeCN, 50:50) provided **4.55b** (0.12 g, 76 %) as a white solid. **R_f** = 0.12 (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); [α]_D²⁵ -10 (*c* 1.1, MeOH); **Formula** C₉₉H₁₀₁N₄Na₃O₂₉S₃; **MW** 1976.0453 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3457, 2934, 1728, 1642, 1449, 1267, 1207, 1106, 1052 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 11.66 (s, 1H), 9.00 (appd, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.58 (appd, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.50 (appd, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.30 (appd, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.12 – 8.04 (m, 4H), 7.84 (s, 1H), 7.62 (appt, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.54 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.48 – 7.15 (m, 27H), 6.99 – 6.95 (m, 2H), 6.93 – 6.88 (m, 5H), 5.77 (appd, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J* = 9.9, 8.2 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.92 – 4.81 (m, 3H)*, 4.79 – 4.65 (m, 8H), 4.59 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.56 – 4.53 (m, 1H), 4.52 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.43 – 4.37 (m, 3H), 4.16 (appq, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.02 – 3.94 (m, 2H), 3.92 (appt, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 10.3, 3.6 Hz, 1H), 3.73 (appd, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J* = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 9.6, 6.7 Hz, 1H), 2.88 – 2.80 (m, 1H), 2.75 – 2.70 (m, 3H), 2.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.05 – 1.89 (m, 2H),

1.83 – 1.74 (m, 4H), 1.62 – 1.44 (m, 2H), 1.16 – 1.13 (m, 6H), 1.08 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.3, 170.8, 168.3, 168.1, 166.1, 165.8, 147.7, 142.9, 141.4, 140.7, 138.8, 138.7, 138.7, 137.7, 135.5, 135.4, 134.9, 133.2, 133.1, 132.7, 130.5, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.3, 127.3, 127.3, 127.2, 127.1, 126.9, 126.0, 124.0, 123.9, 122.5, 122.2, 100.6, 99.4, 78.9, 77.9, 77.6, 77.5, 77.3, 76.9, 75.4, 74.8, 73.2, 72.8, 72.3, 72.1, 71.5, 71.3, 69.4, 67.7, 67.5, 67.3, 66.0, 49.4, 38.8, 36.3, 32.1, 28.6, 25.9, 24.6, 24.5, 20.6, 20.6, 18.8, 15.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 3 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{99}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{23}\text{S}_3$ 999.2686; Found 999.2692 (+0.64 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

Sodium 8-(5-(1-((*S*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)naphthalene-1,3,6-trisulfonate (**4.66a**)

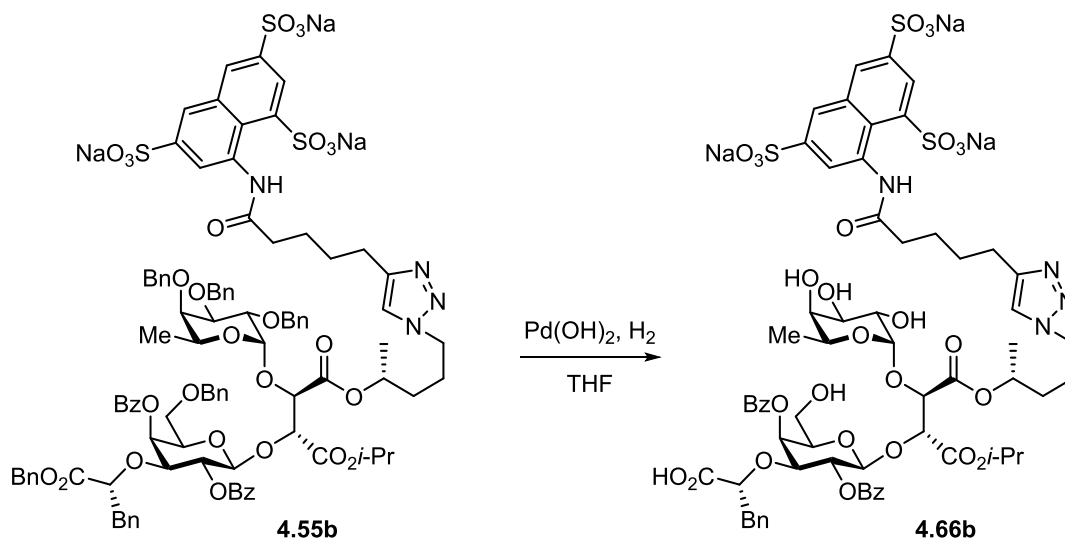


Compound **4.66a** was prepared from **4.55a** (92 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (3.9 mL, 0.012 M) and 15 % wt. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (63.2 mg, 0.0675 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 60:40) provided **4.66a** (37 mg, 51 %) as a white solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +1.3$ (c 1.1, MeOH); **Formula** $\text{C}_{64}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_{29}\text{S}_3$; **MW** 1525.4203 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3441, 2931, 1726, 1647, 1444, 1272,

1197, 1085, 1040 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 11.66 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.58 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.30 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.22 (appd, $J = 7.3$ Hz, 2H), 8.03 – 8.00 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.64 (appt, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.59 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.52 – 7.48 (m, 4H), 7.09 (appd, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.85 (appt, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.75 (appt, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.81 (appd, $J = 2.9$ Hz, 1H), 5.45 (dd, $J = 9.9, 8.0$ Hz, 1H), 5.09 – 5.03 (m, 1H)*, 4.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.65 – 4.58 (m, 1H), 4.45 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.31 – 4.21 (m, 4H), 4.00 (appq, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.85 (appt, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 10.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.59 – 3.56 (m, 3H), 2.84 – 2.76 (m, 3H), 2.70 – 2.60 (m, 3H), 1.87 – 1.74 (m, 6H), 1.49 – 1.40 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.25 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 176.7, 173.4, 169.0, 167.6, 167.1, 165.7, 147.5, 142.9, 141.4, 140.6, 137.8, 134.9, 133.1, 132.9, 132.6, 130.5, 130.2, 130.0, 129.7, 129.5, 129.1, 128.1, 127.8, 127.2, 126.9, 125.3, 123.9, 123.9, 122.5, 122.1, 102.1, 101.4, 79.6, 78.1, 77.0, 75.2, 74.6, 72.0, 71.8, 71.6, 70.2, 70.0, 68.2, 67.4, 66.5, 60.3, 49.4, 39.2, 36.2, 32.2, 28.6, 26.0, 24.6, 24.5, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ Calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{29}\text{S}_3$ 774.1512; Found 774.1497 (-1.96 ppm).

*Hidden under H_2O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

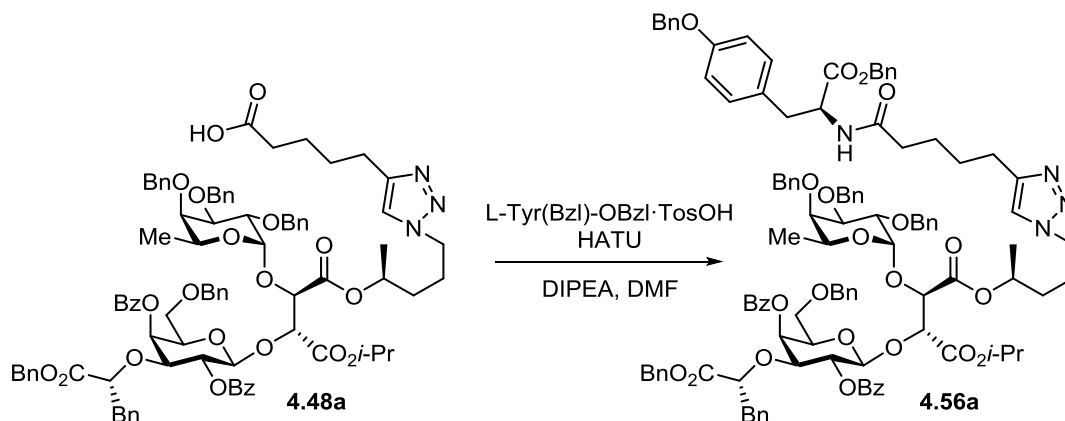
Sodium 8-(5-(1-((*R*)-4-(((2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-((*R*)-1-carboxy-2-phenylethoxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-isopropoxy-4-oxo-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butanoyl)oxy)pentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)pentanamido)naphthalene-1,3,6-trisulfonate (4.66b)



Compound **4.66b** was prepared from **4.55b** (0.11 g, 0.058 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (4.8 mL, 0.012 M) and 15 % wt. Pd(OH)₂ (78.3 mg, 0.0837 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeOH, 70:30) provided **4.66b** (66 mg, 75 %) as a white solid. $[\alpha]_D^{25} +6.8$ (*c* 2.7, MeOH); **Formula** C₆₄H₇₁N₄Na₃O₂₉S₃; **MW** 1525.4203 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3446, 2981, 2935, 1725, 1648, 1594, 1444, 1272, 1202, 1041 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.98 (appd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.57 (appd, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.51 (appd, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.31 (appd, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.26 – 8.20 (m, 2H), 8.02 – 7.98 (m, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.52 – 7.44 (m, 4H), 7.08 (appd, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.84 (appt, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.74 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.82 (appd, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.46 (dd, *J* = 10.0, 8.0 Hz, 1H), 5.09 – 5.01 (m, 1H), 4.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.68 – 4.61 (m, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 3H), 4.31 (dd, *J* = 10.0, 3.1 Hz, 1H), 4.26 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.03 (appq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.91 (appt, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 10.2, 3.2 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 10.3, 3.9 Hz, 1H), 3.62 – 3.57 (m, 3H), 2.85 – 2.76 (m, 3H), 2.73 – 2.66 (m, 1H), 2.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.97 – 1.80 (m, 6H), 1.58 – 1.37 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.00 (d, *J*

= 6.6 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 176.9, 173.4, 169.0, 167.8, 167.2, 165.7, 147.5, 142.8, 141.4, 140.6, 137.9, 134.9, 133.1, 133.0, 132.7, 130.5, 130.2, 130.0, 129.7, 129.5, 129.1, 128.0, 127.9, 127.2, 126.9, 125.3, 124.0, 123.9, 122.6, 122.3, 101.8, 101.4, 79.7, 77.8, 77.1, 75.2, 74.7, 72.0, 72.0, 71.7, 70.2, 70.0, 68.2, 67.4, 66.6, 60.3, 49.6, 39.3, 36.3, 32.1, 28.7, 25.8, 24.6, 24.5, 20.6, 20.6, 18.4, 15.1 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+2Na]²⁺ Calcd for C₆₄H₇₁N₄Na₅O₂₉S₃ 785.1422; Found 785.1429 (+0.93 ppm).

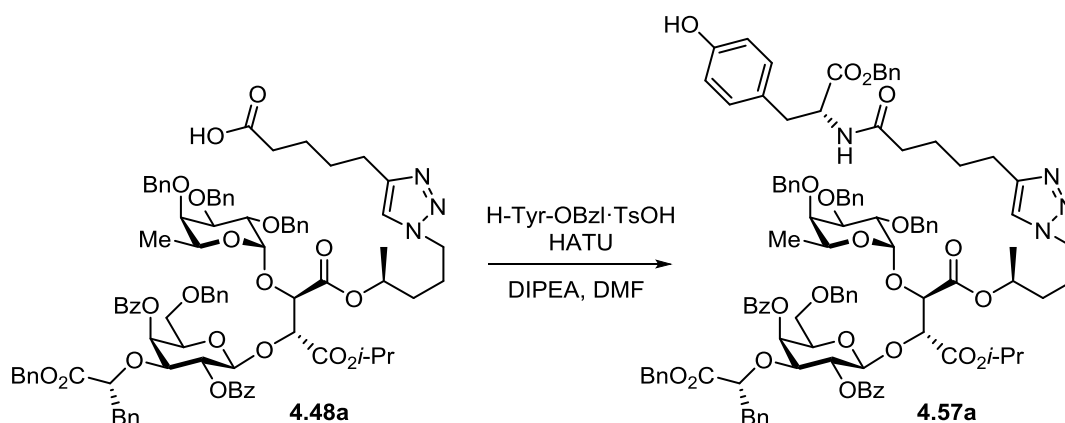
1-((*S*)-5-(4-(5-(((*S*)-1-(Benzyloxy)-3-(4-(benzyloxy)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)amino)-5-oxopentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-yl) 4-isopropyl (2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzoyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.56a)



Compound **4.56a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μL, 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and L-Tyr(Bzl)-OBzl·TosOH (27 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.) as nucleophile. Purification by flash chromatography (hexanes:EtOAc, 30:70) provided **4.56a** (0.11 g, 87 %) as a white solid. **R_f** = 0.29 (hexanes/EtOAc, 3:7); [**α**]_D²⁵ +7.5 (*c* 1.7, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₁₂H₁₁₈N₄O₂₃; **MW** 1888.1810 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3032, 2936, 2867, 2243, 1731, 1658, 1512, 1454, 1269, 1176, 1106 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 8.04 (m, 4H), 7.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.48 – 7.20 (m, 39H), 6.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.95 – 6.89 (m, 7H), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.53 (dd, *J* = 9.8, 8.1 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 5.02 – 4.99 (m, 3H), 4.95 – 4.88 (m, 3H), 4.86 – 4.79 (m, 3H), 4.74 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 2H), 4.69 – 4.64 (m,

2H), 4.65 – 4.60 (m, 2H), 4.58 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.53 – 4.46 (m, 2H), 4.44 – 4.38 (m, 2H), 4.25 – 4.14 (m, 2H), 4.06 (appq, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.95 – 3.88 (m, 2H), 3.84 (dd, $J = 9.9, 3.3$ Hz, 1H), 3.73 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 9.4, 5.6$ Hz, 1H), 3.52 (apps, 1H), 3.47 (dd, $J = 9.4, 7.4$ Hz, 1H), 3.10 – 3.02 (m, 2H), 2.85 (dd, $J = 13.7, 5.6$ Hz, 1H), 2.75 (dd, $J = 13.7, 6.9$ Hz, 1H), 2.67 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.85 – 1.74 (m, 2H), 1.70 – 1.65 (m, 4H), 1.54 – 1.40 (m, 2H), 1.21 – 1.15 (m, 9H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.3, 171.6, 170.5, 168.1, 167.9, 165.6, 165.4, 157.9, 147.7, 138.9, 138.8, 138.7, 137.5, 136.9, 135.6, 135.2, 135.1, 133.2, 132.6, 130.6, 130.3, 130.0, 129.5, 129.4, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 126.3, 120.7, 114.9, 100.2, 99.6, 79.3, 78.0, 77.5, 77.4, 77.1, 76.7, 75.7, 74.8, 73.8, 73.0, 72.7, 72.5, 71.3, 71.2, 70.0, 69.1, 67.8, 67.4, 67.2, 66.3, 66.2, 53.1, 49.6, 39.1, 37.0, 36.1, 32.5, 28.8, 26.1, 25.3, 24.9, 21.6, 21.6, 19.7, 16.6 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 4 peaks are missing; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{112}\text{H}_{118}\text{N}_4\text{NaO}_{23}$ 1909.8079; Found 1909.8055 (-1.27 ppm).

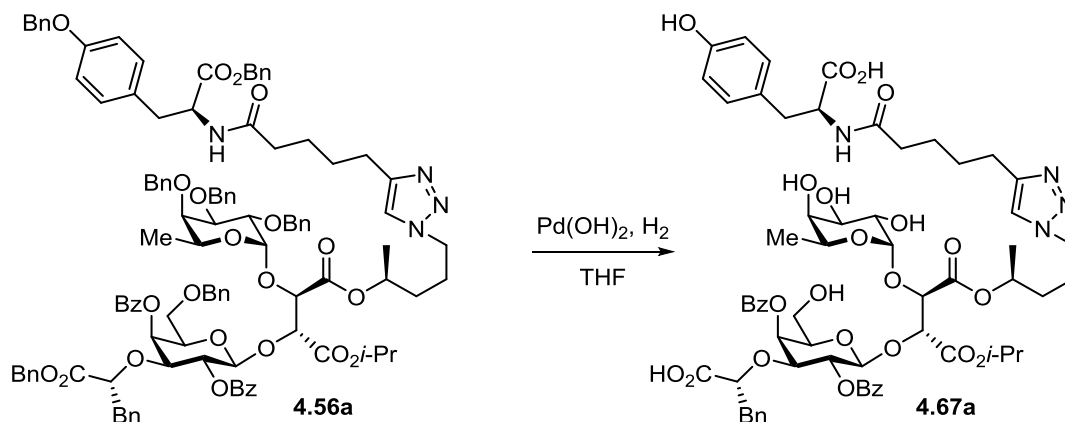
1-((*S*)-5-(4-(5-(((*R*)-1-(Benzyloxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)amino)-5-oxopentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-yl) 4-isopropyl (2*R*,3*R*)-3-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-bis(benzyloxy)-4-(((*R*)-1-(benzyloxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)oxy)-6-((benzyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinate (4.57a)



Compound **4.57a** was prepared from **4.48a** (0.10 g, 0.065 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **A**, using DMF (0.65 mL, 0.10 M), diisopropylethylamine (34 μL , 0.19 mmol, 3.0 eq.), HATU (32 mg, 0.084 mmol, 1.3 eq.) and H-Tyr-OBzl·TosOH (57 mg, 0.13 mmol, 2.0 eq.)

as nucleophile. Purification by flash chromatography (CH₂Cl₂:MeOH, 92:8) provided **4.57a** (0.11 g, 97 %) as a clear gum. **R_f** = 0.24 (hexanes/EtOAc, 2:8); [**α**]_D²⁵ +2.0 (*c* 1.4, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₀₅H₁₁₂N₄O₂₃; **MW** 1798.0560 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3355, 3033, 2931, 2249, 1728, 1449, 1267, 1106 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 8.03 (m, 4H), 7.58 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.50 – 7.18 (m, 34H), 6.98 (appd, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.96 – 6.87 (m, 5H), 6.83 (appd, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.70 (appd, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.72 (appd, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.54 (dd, *J* = 9.5, 8.4 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.96 – 4.87 (m, 3H), 4.87 – 4.79 (m, 3H), 4.75 – 4.70 (m, 2H), 4.69 – 4.63 (m, 3H), 4.62 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.52 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.26 – 4.20 (m, 2H), 4.08 (appq, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.95 – 3.89 (m, 2H), 3.85 (dd, *J* = 9.9, 3.2 Hz, 1H), 3.74 (appt, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 9.3, 5.6 Hz, 1H), 3.53 (apps, 1H), 3.47 (dd, *J* = 8.9, 7.7 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 14.1, 5.4 Hz, 1H), 2.91 – 2.83 (m, 2H), 2.75 (dd, *J* = 13.7, 6.9 Hz, 1H), 2.61 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.20 – 2.05 (m, 2H), 1.90 – 1.76 (m, 2H), 1.59 – 1.39 (m, 6H), 1.21 – 1.14 (m, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 171.8, 170.5, 168.2, 168.0, 165.7, 165.6, 155.5, 147.5, 138.9, 138.8, 138.6, 137.5, 135.6, 135.2, 135.2, 133.3, 132.7, 130.6, 130.3, 130.0, 129.5, 129.4, 128.6, 128.5, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.0, 126.3, 121.2, 116.0, 100.3, 99.6, 79.3, 78.1, 77.6, 77.4, 76.9*, 76.7, 75.7, 74.8, 73.8, 73.1, 72.7, 72.5, 71.4, 71.2, 69.2, 67.8, 67.5, 67.2, 66.3, 66.2, 52.9, 49.9, 39.1, 37.1, 36.1, 32.4, 28.7, 26.0, 25.1, 25.1, 21.6, 21.6, 19.7, 16.5 ppm. Due to overlapping carbon signals in the aromatic region, 4 peaks are missing; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₁₀₅H₁₁₂N₄NaO₂₃ 1819.7610; Found 1819.7597 (-0.67 ppm). *Hidden under residual CHCl₃ peaks. Approximate displacement obtained from the HSQC spectrum.

(*R*)-2-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,5-Bis(benzoyloxy)-2-(((2*R*,3*R*)-4-(((*S*)-5-(4-(5-(((*S*)-1-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pentan-2-yl)oxy)-1-isopropoxy-1,4-dioxo-3-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)butan-2-yl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)oxy)-3-phenylpropanoic acid (X)



Compound **4.67a** was prepared from **4.56a** (0.11 g, 0.058 mmol, 1.0 eq.) according to general procedure **B** using THF (4.8 mL, 0.012 M) and 15 % wt. Pd(OH)₂ (79.1 mg, 0.0845 mmol, 1.45 eq.). Purification by flash chromatography (C18 reversed-phase silica, H₂O:MeOH, 60:40) provided **4.67** (26 mg, 36 %) as a white solid. **4.67a** could also be obtained from **4.57a** using the same procedure. $R_f = 0.21$ (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O, 6:3:1); $[\alpha]_D^{25} +21$ (*c* 0.79, MeOH); **Formula** C₆₃H₇₆N₄O₂₃; **MW** 1257.3060 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3376, 2936, 1724, 1599, 1449, 1269, 1084 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.16 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.05 (appd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.71 – 7.63 (m, 2H), 7.58 (appt, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.53 – 7.45 (m, 4H), 7.05 (appt, *J* = 7.9 Hz, 4H), 6.86 (appt, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.77 (appt, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.66 (appd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.81 (appd, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J* = 9.8, 8.2 Hz, 1H), 5.10 – 5.02 (m, 1H), 4.88 – 4.87 (m, 1H)*, 4.75 – 4.71 (m, 2H), 4.67 – 4.60 (m, 1H), 4.53 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.28 – 4.21 (m, 2H), 4.07 (appq, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.86 (appt, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 10.2, 3.2 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 10.3, 3.8 Hz, 1H), 3.61 – 3.56 (m, 3H), 3.14 (dd, *J* = 14.0, 4.5 Hz, 1H), 2.89 – 2.70 (m, 3H), 2.67 – 2.63 (m, 1H), 2.23 – 2.17 (m, 1H), 1.87 – 1.74 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 3H), 1.49 – 1.40 (m, 2H), 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.26 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 176.2, 175.2, 173.6, 168.6, 167.8, 166.5, 165.6, 155.6, 147.4, 137.1, 133.0, 132.5, 130.6, 130.1, 130.0, 129.7, 129.5, 129.1, 128.7, 128.1, 127.8, 127.3, 125.5,

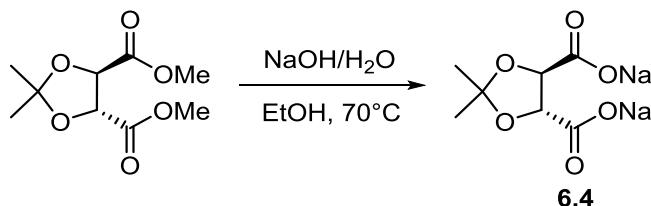
121.8, 114.6, 101.9, 101.7, 78.4, 78.3**, 77.5, 75.7, 74.3, 72.1, 71.6, 71.2, 70.1, 69.8, 68.5, 67.3, 66.4, 60.2, 55.5, 49.4, 39.0, 37.0, 35.4, 32.3, 28.4, 25.9, 24.9, 24.6, 20.6, 20.6, 18.9, 15.2 ppm;
HRMS (ESI/IT) m/z : [M+2Na]²⁺ Calcd for C₆₃H₇₆N₄Na₂O₂₃ 651.2342; Found 651.2333 (-1.38 ppm).

*Hidden under H₂O signal but confirmed by analysis of COSY and HSQC spectra

**This carbon does not appear on the ¹³C NMR spectrum, but an HSQC experiment shows correlation with the hydrogen of this carbon at this displacement.

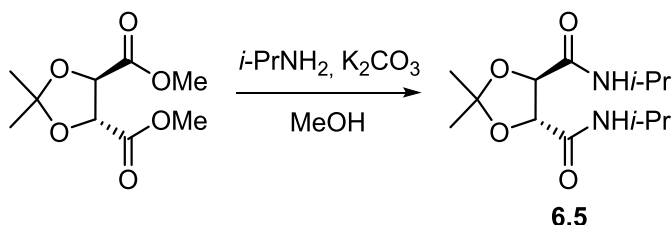
Section expérimentale du chapitre 6

Sodium (4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4,5-dicarboxylate (**6.4**)



A solution of dimethyl 2,3-O-isopropylidene-L-tartrate (0.20 mL, 1.1 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (2.2 mL, 0.50 M) was heated at 70°C. To this mixture was added dropwise a solution of sodium NaOH (97 mg, 2.4 mmol, 2.2 eq.) in a 5:1 mixture of EtOH/H₂O (2.4 mL, 1.0 M). The reaction mixture was stirred for 15 minutes at 70°C, then the volatiles were concentrated *in vacuo*. The residue was suspended in EtOH, filtered and washed with EtOH to afford **6.4** as a white solid in quantitative yields. $[\alpha]_D^{25}$ –27 (*c* 1.4, H₂O); **Formula** C₇H₈Na₂O₆; **MW** 234.1145 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3378, 2989, 1672, 1404, 1207, 1059 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, D₂O) δ 4.38 (s, 2H), 1.35 (s, 6H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, D₂O) δ 177.2, 111.7, 79.4, 25.6 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₇H₈Na₃O₆ 257.0008; Found 257.0005 (-1.17 ppm).

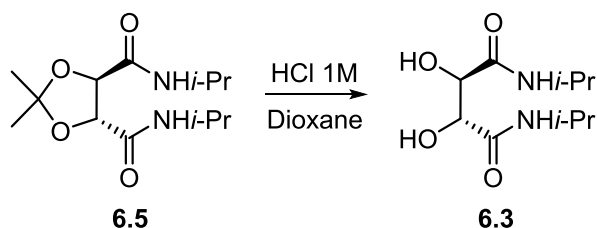
(4*R*,5*R*)-*N*⁴,*N*⁵-Diisopropyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4,5-dicarboxamide (**6.5**)



To a solution of dimethyl 2,3-O-isopropylidene-L-tartrate (0.84 mL, 4.6 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (3.2 mL, 1.4 M) at 0°C was added isopropylamine (1.6 mL, 18 mmol, 4.0 eq.) and potassium carbonate (16 mg, 0.12 mmol, 0.025 eq.). The reaction mixture was stirred at reflux for 24 hours. The resulting mixture was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 50:50) provided **6.5** (0.89 g, 71 %) as a white powder. **R_f** = 0.23 (hexanes/EtOAc, 50:50); $[\alpha]_D^{25}$ –6.5 (*c* 1.2, CH₂Cl₂); **Formula** C₁₃H₂₄N₂O₄; **MW** 272.3450 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3295, 3092, 2973, 1685, 1637, 1546, 1379, 1256, 1154 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 6.90 – 6.78 (m, 2H), 4.47 (s, 2H), 4.15 – 4.04 (m, 2H), 1.47 (s, 6H),

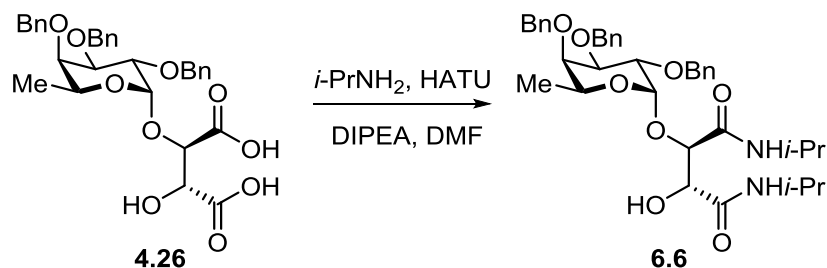
1.19 – 1.16 (m, 12H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 168.7, 112.1, 77.3, 41.3, 26.0, 22.6, 22.6 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_4$ 295.1628; Found 295.1629 (+0.17 ppm).

(2*R*,3*R*)-2,3-Dihydroxy-*N*¹,*N*⁴-diisopropylsuccinamide (6.3)



A solution of **6.5** (0.89 g, 3.3 mmol, 1.0 eq.) in 1,4-dioxane (16 mL, 0.20 M) and 1M HCl (16 mL, 0.20 M) was stirred at 50°C for 24 hours. To the resulting mixture was added anhydrous NaHCO_3 until neutral pH and was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) provided **6.3** (0.65 g, 86 %) as a white solid. R_f = 0.23 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5); $[\alpha]_D^{25}$ +68 (c 0.45, CH_2Cl_2); **Formula** $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$; **MW** 232.2800 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3301, 2973, 1658, 1642, 1550, 1116, 1068 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.99 – 6.87 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 4.10 – 4.00 (m, 2H), 1.20 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.17 (d, J = 6.5 Hz, 6H) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.0, 69.9, 41.4, 22.6, 22.3 ppm; HRMS (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_4$ 255.1315; Found 255.1313 (-0.75 ppm).

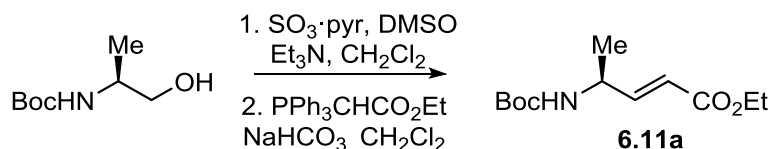
(2*R*,3*R*)-2-Hydroxy-*N*¹,*N*⁴-diisopropyl-3-(((2*S*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)succinamide (6.6)



A solution of **4.26** (0.10 g, 0.18 mmol, 1.0 eq.) in DMF (0.9 mL, 0.2 M) cooled at 0°C was treated with diisopropylethylamine (0.12 mL, 0.71 mmol, 4.0 eq.). After stirring 5 minutes, $i\text{-PrNH}_2$ (33 μL , 0.39 mmol, 2.2 eq.) was added. After another 5 minutes, HATU (0.15 g, 0.39 mmol, 2.2 eq.) was added in 3 portions over 30 minutes. The reaction mixture was stirred for

30 minutes at 0°C, then 3 hours at room temperature before it was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes:EtOAc, 20:80) provided **6.6** (94 mg, 82 %) as a white gum. R_f = 0.24 (hexanes/EtOAc, 3:7); $[\alpha]_D^{25}$ –63 (*c* 0.64, CH₂Cl₂); **Formula** C₃₇H₄₈N₂O₈; **MW** 648.7970 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3299, 3063, 2973, 2931, 1649, 1529, 1265, 1097, 1044 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 4H), 7.36 – 7.25 (m, 10H), 5.51 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.83 – 4.78 (m, 2H), 4.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.15 (dd, *J* = 6.5, 3.2 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, 1H), 3.98 – 3.88 (m, 2H), 3.87 – 3.79 (m, 2H), 3.78 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.07 – 1.00 (m, 9H), 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, (CD₃)₂SO) δ 170.1, 168.9, 139.4, 139.3, 139.2, 128.7, 128.5, 128.5, 128.2, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 98.7, 78.9, 78.3, 77.8, 75.5, 74.7, 72.4, 71.9, 71.5, 67.3, 40.9, 40.7, 22.8, 22.7, 22.6, 22.3, 16.8 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₃₇H₄₈N₂NaO₈ 671.3303; Found 671.3302 (-0.11 ppm).

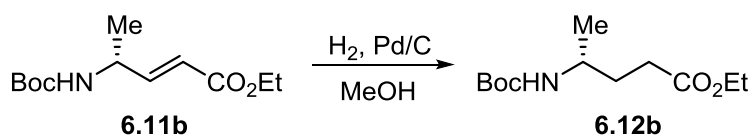
Ethyl (*S,E*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pent-2-enoate (**6.11a**)



To a solution of Boc-L-alaninol (1.0 g, 5.7 mmol, 1.0 eq.) and DMSO (4.9 mL, 69 mmol, 12 eq.) in CH₂Cl₂ (5.7 mL, 1.0 M) at 0°C was added Et₃N (3.2 mL, 23 mmol, 4.0 eq.) followed by SO₃·Pyr (2.3 g, 14 mmol, 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour slowly warming up to room temperature. Water (10 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. To the crude aldehyde in CH₂Cl₂ (29 mL, 0.20 M) was added NaHCO₃ (4.8 g, 57 mmol, 10 eq.) and (carbethoxymethylene) triphenylphosphorane (2.4 g, 6.9 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The resulting mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 70:30) provided **6.11a** (1.3 g, 91 %) as a pale yellow oil. NMR spectroscopic

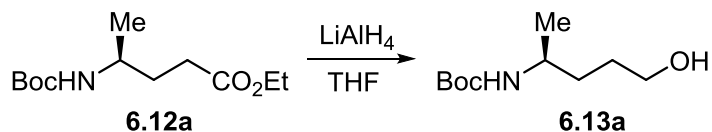
1169 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.37 (s, 1H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.74 – 3.62 (m, 1H), 2.37 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.84 – 1.67 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 155.3, 78.9, 60.3, 46.1, 32.0, 31.1, 28.3, 21.3, 14.1 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NNaO}_4$ 268.1519; Found 268.1519 (-0.19 ppm).

Ethyl (*R*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentanoate (6.12b)



Compound **6.12b** was prepared from **6.11b** (1.0 g, 4.1 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **6.12a**, using MeOH (21 mL, 0.20 M) and 10 % wt. Pd/C (0.44 g, 0.41 mmol, 0.10 eq.). The desired product **6.12b** (0.91 g, 91 %) was obtained as a clear liquid that was used without further purification. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -0.31$ (c 1.6, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.37 (s, 1H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.74 – 3.62 (m, 1H), 2.37 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.84 – 1.67 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 155.3, 78.9, 60.3, 46.1, 32.0, 31.1, 28.3, 21.3, 14.1 ppm.

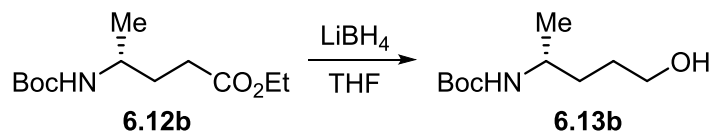
***tert*-Butyl (*S*)-(5-hydroxypentan-2-yl)carbamate (6.13a)**



To a solution of LiAlH_4 (0.34 g, 9.0 mmol, 1.0 eq.) in THF (15 mL, 0.60 M) at 0°C was added dropwise a solution of **6.12a** (1.9 g, 9.0 mmol, 1.0 eq.) in THF (15 mL, 0.60 M). The reaction mixture was stirred for 40 min at 0°C , then $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (3.6 g, 11 mmol, 1.3 eq.) was added slowly. The reaction mixture was stirred at 0°C for 5 minutes, warmed to room temperature and stirred for another 45 minutes. The resulting mixture was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 50:50) provided **6.13a** (67 mg, 23 %) as a pale yellow oil. Using the protocol for the synthesis of **6.13b** should result in better yields. $R_f = 0.10$ (hexanes/EtOAc, 60:40); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +0.79$ (c 4.5, MeOH); **Formula** $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_3$; **MW** 203.2820 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3330, 2974, 2934, 1684, 1531, 1366, 1250,

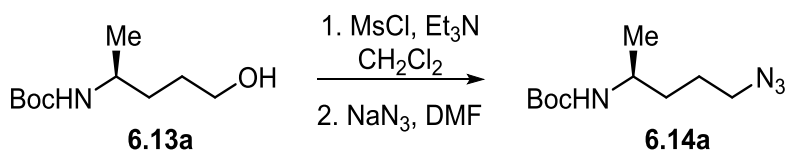
1173, 1073 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.54 (s, 1H), 3.61 (t, J = 6.3 Hz, 3H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.48 – 1.43 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.10 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 155.6, 79.1, 62.3, 46.2, 33.7, 29.0, 28.3, 21.2 ppm; **HRMS** (ESI/IT) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NNaO}_3$ 226.1414; Found 226.1415 (+0.48 ppm).

***tert*-Butyl (*R*)-(5-hydroxypentan-2-yl)carbamate (6.13b)**



To a solution of **6.12b** (0.10 g, 0.41 mmol, 1.0 eq.) in THF (1.4 mL, 0.30 M) at room temperature was added a 2M solution of LiBH_4 (0.41 mL, 0.82 mmol, 2.0 eq.) The reaction mixture was stirred for 20 hours, then cooled to 0°C before dropwise addition of a saturated aqueous solution of NH_4Cl until no more bubbles are formed. H_2O (5 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with HCl 0.1 M (5 mL) and brine (5 mL), dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/ EtOAc , 50:50) provided **6.13b** (71 mg, 86 %) as a pale yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -0.26 (c 2.3, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4.54 (s, 1H), 3.61 (t, J = 6.3 Hz, 3H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.48 – 1.43 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.10 (d, J = 6.6 Hz, 3H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 155.6, 79.1, 62.3, 46.2, 33.7, 29.0, 28.3, 21.2 ppm.

***tert*-Butyl (*S*)-(5-azidopentan-2-yl)carbamate (6.14a)**



To a solution of **6.13a** (4.6 g, 23 mmol, 1.0 eq.) in CH_2Cl_2 (0.11 L, 0.20 M) at 0°C was added Et_3N (4.1 mL, 30 mmol, 1.3 eq.) followed by MsCl (1.9 mL, 25 mmol, 1.1 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour at 0°C . Water (100 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2×100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. To the crude mesylate in DMF (0.11 L, 0.20 M) at room temperature was added NaN_3 (5.9 g, 91 mmol, 4.0 eq.). The reaction mixture was stirred at 100°C for 16 hours. Brine (100 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with a 1:1

mixture of hexanes/Et₂O (100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 80:20) provided **6.14a** (4.7 g, 91 %) as a yellow oil. *R_f* = 0.40 (hexanes/EtOAc, 80:20); [α]_D²⁵ –1.5 (*c* 3.2, MeOH); **Formula** C₁₀H₂₀N₄O₂; **MW** 228.2960 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3336, 2975, 2933, 2096, 1686, 1519, 1359, 1246, 1172 cm^{–1}; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 4.33 (s, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.34 – 3.28 (m, 2H), 1.72 – 1.60 (m, 2H), 1.55 – 1.42 (m, 11H), 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 155.4, 79.1, 51.2, 46.0, 34.4, 28.4, 25.5, 21.4 ppm; **HRMS** (ESI/IT) *m/z* : [M+Na]⁺ Calcd for C₁₀H₂₀N₄NaO₂ 251.1478; Found 251.1479 (+0.27 ppm).

***tert*-Butyl (*R*)-(5-azidopentan-2-yl)carbamate (**6.14b**)**



Compound **6.14b** was prepared from **6.13b** (3.3 g, 16 mmol, 1.0 eq.) according to procedure for **6.14a**, using CH₂Cl₂ (82 mL, 0.20 M), Et₃N (3.0 mL, 21 mmol, 1.3 eq.) and MsCl (1.4 mL, 18 mmol, 1.1 eq.) for the first step, and DMF (82 mL, 0.20 M and NaN₃ (4.3 g, 67 mmol, 4.0 eq.) for the second step. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 80:20) provided **6.14b** (3.5 g, 94 %) as a yellow oil. [α]_D²⁵ +0.68 (*c* 1.2, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 4.33 (s, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.34 – 3.28 (m, 2H), 1.72 – 1.60 (m, 2H), 1.55 – 1.42 (m, 11H), 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 155.4, 79.1, 51.2, 46.0, 34.4, 28.4, 25.5, 21.4 ppm.

Bibliographie : Partie expérimentale

1. Calosso, M.; Tambutet, G.; Charpentier, D.; St-Pierre, G.; Vaillancourt, M.; Bencheqroun, M.; Gratton, J.-P.; Prévost, M.; Guindon, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5, 1054.
2. Calosso, M.; Charpentier, D.; Vaillancourt, M.; Bencheqroun, M.; St-Pierre, G.; Wilkes, B. C.; Guindon, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 1045.
3. Garegg, P. J.; Kvarnström, I.; Niklasson, A.; Niklasson, G.; Svensson, S. C. T. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 933.
4. Yadav, J. S.; Mishra, A. K.; Dachavaram, S. S.; Ganesh Kumar, S.; Das, S. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2921.
5. Suzuki, Y.; Wakatsuki, J.; Tsubaki, M.; Sato, M. *Tetrahedron* **2013**, 69, 9690.
6. Jamieson, A. G.; Sutherland, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 735.
7. Wu, Y.; Shen, X.; Yang, Y.-Q.; Hu, Q.; Huang, J.-H. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3857.
8. Proteau-Gagne, A.; St-Jean, F.; Morin, C.; Gendron, L.; Rousseau, E.; Dory, Y. L. *Chem. Nat. Compd.* **2011**, 46, 841.
9. Li, C.; Xu, W.; Vadivel, S. K.; Fan, P.; Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6423.
10. Cowper, B.; Sze, T. M.; Premdjee, B.; Bongat White, A. F.; Hacking, A.; Macmillan, D. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3208.
11. Meng, Q.; Hesse, M. *Tetrahedron* **1991**, 47, 6251.

